

Proteinkinase-Inhibitoren mit neuartiger chemischer Grundstruktur

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Renate Determann
aus Sögel

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	28.03.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	23.05.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Determann, R., Dreher, J., Baumann, K., Preu, L., Jones, P. G., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C.: 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)-pyrimidines – a multikinase inhibitor scaffold with antiproliferative activity toward cancer cell lines. Eur. J. Med. Chem. **2012**, zur Publikation eingereicht.

Tagungsbeiträge

Determann, R., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Preu, L., Kunick, C.: 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidines: A series of novel multikinase inhibitors. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Jena (2009).

Determann, R., Dreher, J., Baumann, K., Preu, L., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C.: A novel antiproliferative PLK1 inhibitor chemotype based on a 2-anilinopyrimidine parent scaffold. (Poster) Frontiers in Medicinal Chemistry, Stockholm, Schweden (2011).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2008 bis März 2012 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine engagierte Betreuung und Unterstützung sehr herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferats.

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Proteinkinasen: Schaltstellen in der Signaltransduktion	2
1.3 Aufbau der Proteinkinasen	4
1.3.1 Überblick der konformativen Änderungen	4
1.3.2 Aufbau der ATP-Bindetasche	6
1.4 Klassifizierung der Proteinkinasen	8
1.4.1 Rezeptortyrosinkinasen	9
1.4.2 Serin-/Threoninkinasen	10
1.5 Therapieoptionen	17
1.5.1 Inhibition der katalytischen Domäne	17
1.5.2 Inhibition der extrazellulären Rezeptor-Liganden-Interaktion	26
1.5.3 Inhibition durch Abfangen der Liganden	27
1.5.4 Inhibition der Genexpression	28
1.6 Indirubin als Leitstruktur für Tumorthapeutika	29
2 Zielsetzung	32
2.1 Anilinopyrimidine	32
2.2 Tetrabromisoindole	34
2.3 Mini-Indirubine	35
3 Synthese	37
3.1 Darstellung der 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine 31	37
3.1.1 Synthese des Enaminoketons 39a	37
3.1.2 Synthese der Phenylguanidiniumnitrate 43	38
3.1.3 Synthese der 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine 31	39
3.2 Darstellung der Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine 57	41
3.3 Darstellung der Tetrabromisoindole 67	57
3.3.1 Synthese der 2-Aryl-4,5,6,7-tetrabrom-1 <i>H</i> -isoindol-1,3(2 <i>H</i>)-dione	57
3.3.2 Spektroskopische Untersuchung von 67f	59
3.3.3 Darstellung der Verbindung 67l	62

3.3.4	Stabilitätsuntersuchungen an Tetrabromisoindolen	64
3.4	Darstellung der Mini-Indirubine	67
3.4.1	Darstellung des Hydrazinophthalimids	67
3.4.2	Synthese der Pyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-6,8(1 <i>H</i> ,7 <i>H</i>)-dione 36	69
3.4.3	Darstellung der Verbindung 36f	73
3.4.4	Synthese der Dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one 37	79
3.4.5	Darstellung der Verbindung 37g	81
3.4.6	Vergleich der Indolsysteme	82
4	Biologische Aktivität	83
4.1	Anilinopyrimidine	83
4.1.1	Biologische Testungen der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität	83
4.1.2	Biologische Testungen der antiproliferativen Aktivität	88
4.1.3	Matrix Compare Analyse	93
4.1.4	Potentieller Bindemodus von 31j in PLK1	94
4.2	Tetrabromisoindole	96
4.2.1	Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Tetrabromisoindole 67	96
4.2.2	Antiproliferative Aktivität der Verbindungen 67g und 67l	98
4.3	Mini-Indirubine	99
4.3.1	Untersuchungen der kinaseinhibitorischen Aktivität	99
4.3.2	Ausgewählte Proteinkinasen	102
5	Zusammenfassung	106
5.1	Anilinopyrimidine	106
5.2	Tetrabromisoindole	107
5.3	Mini-Indirubine	107
6	Summary	109
6.1	Anilinopyrimidines	109
6.2	Tetrabromisoindoles	110
6.3	Mini-Indirubines	110
7	Experimenteller Teil	112
7.1	Allgemeines	112
7.1.1	Geräte und Methoden	112

7.1.2	Bezug der Ausgangsmaterialien	115
7.2	Synthesen und analytische Daten	116
7.3	Biologische Daten	171
7.3.1	Proteinkinase-Assay (ProQinase)	171
7.3.2	Kinaseassay mit Casein Kinase 2	176
7.3.3	In vitro Assay mit CDKs, CLKs und verwandten Kinasen	177
7.3.4	Tumorzelllinien-Screening	183
7.3.5	Durchführung der molekularen Docking-Studien	187
7.3.6	Berechnung der Elektronendichteverteilung	187
8	Literaturverzeichnis	188

Abkürzungsverzeichnis

Å: Ångström; AAV: Allgemeine Arbeitsvorschrift; Abb.: Abbildung; ACN: Acetonitril; AcOH: Essigsäure; AHR: *aryl hydrocarbon receptor*; AK: Antikörper; AKT/PKB: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, protein kinase B*; APC-Protein: *adenomatous-polypsis-coli-Protein*; ArH: aromatisches Proton; Asp: Aspartat; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; AUC: *area under the curve*; Bcr-Abl: *breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase*; ber.: berechnet; br: verbreitertes Signal; BSA: *bovine serum albumin*; bzw.: beziehungsweise; ca.: circa; CAMK: *calmodulin-dependetkinases*; CDK: *cyclin-dependent kinase*; CK: *casein kinase*; CKI: *CDK-inhibitory protein*; cKIT: *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*; CLK: *CDC2-like kinase*; CML: Chronisch-Myeloische Leukämie; COSY: *correlated spectroscopy*; δ : chemische Verschiebung; d: Dublett; DAD: *diode array detector*; DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DEPT: *distorsionless enhancement by polarisation transfer*; d.h.: das heißt; DMF-DMA: *N,N*-Dimethylformamid-Dimethylacetal; DMSO: Dimethylsulfoxid; DMSO- d_6 : Hexadeuterondimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; D₂O: Deuteriumoxid; DYRK: *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase*; ECM: extrazelluläre Matrix; EI: Elektronenstoß-Ionisation; EMEA: *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London*; EGF: *epidermal growth factor*; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase-2*; EI: Elektronenstoß-Ionisation; EtOAc: Ethylacetat; ETOH: Ethanol; FA: Fokale Adhäsion; FAK: *focal adhesion kinase*; FDA: *Food and Drug Administration, USA*; FGF: *fibroblast growth factor*; FLT: *FMS-like tyrosine kinase*; gef.: gefunden; GI₅₀: *growth inhibition 50%*; GIST: gastrointestinaler Stromatumor; gk: *gatekeeper*; GSH: Glutathion; GSK-3: *glycogen synthase kinase-3*; GST: Glutathion-S-Transferase; Gly: Glycin; HCC: *hepatocellular carcinoma*; HER/ErbB: *human epidermal growth factor receptor*; H₂O: Wasser; HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation*; HOAc: Essigsäure; HPLC: *high performance liquid chromatography*; HRMS: *high resolution mass spectrometry*; HSQC: *heteronuclear single quantum coherence*; Hz: Hertz; IC₅₀: *inhibitory concentration 50%*; IGF-1R: *Insulin-like growth factor-1 receptor*; IgG: Immunglobulin G; INS-R: Insulin-Rezeptor Kinase; INTEREST: *Iressa non-small cell lung cancer trial evaluating response and survival against Taxotere*; IR: Infrarot; ISEL: *Iressa Survival Evaluation in Lung cancer*; IUPAC: *International Union of Pure*

and Applied Chemistry; IVCLSP: *in vitro cell line screening project*; J: Kopplungskonstante; KDR: *human kinase insert domain receptor*; K-Ras: *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue*; λ_{max} : Absorptionsmaxima; LC₅₀: *lethal concentration 50%*; Lit.: Literatur; log₁₀: dekadischer Logarithmus; m: Multiplett; μW : Mikrowelle; M: molar; MAK: Monoklonaler Antikörper; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; MEK: *mitogen activated protein kinase kinase kinase 1*; MG-MID: *meangraph midpoint*; MHz: Megahertz; Mr: relative Molmasse; MS: Massenspektroskopie; MTC: *medullary thyroid carcinoma*; m/z: Masse pro Ladungseinheit; NaOAc: Natriumacetat; NCI: *National Cancer Institute*; NMR: *nuclear magnetic resonance*; NSCLC: *non-small cell lung cancer*; PCC: *Pearson correlation coefficient*; PBS: *phosphate buffered saline*; PDB: *Protein Data Bank*; PDGF: *platelet derived growth factor*; PDGFR: *platelet derived growth factor receptor*; Phe: Phenylalanin; Ph⁺: Philadelphia-Chromosom-positiv; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; pIC₅₀: negativ dekadischer Logarithmus des IC₅₀-Wertes; PIM: *proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*; pIC₅₀: dekadischer Logarithmus des IC₅₀-Wertes; PKB: *protein kinase B*; PLK-1: *polo-like kinase 1*; PPA: Polyphosphorsäure; ppm: *parts per million*; %ig: prozentig; PUBS: *purple urine bag syndrome*; q: Quartett; quart.: quartär; quin.: Quintett; Raf: *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog*; Ras: *rat sarcoma virus oncogene*; RCC: *renal cell carcinoma*; RET: *rearranged during transfection*; RISC: *RNA-induced silencing complex*; (m/ds/si)RNA: *messenger/double-stranded/small interfering* Ribonukleinsäure; RT: Raumtemperatur; RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase; s: Singulett; SRC: *v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*; s.S.: siehe Seite; Schmp.: Schmelzpunkt; t: Triplett; TCM: Traditionelle Chinesische Chemie; tert.: tertiär; TF: Transkriptionsfaktor; TGI: *total growth inhibition*; TK: Tyrosinkinase; t_M: Totzeit; t_N: Gesamtretentionszeit; TMS: Tetramethylsilan; t_S: Nettoretentionszeit; UV: Ultra-Violett; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; VEGF-R: *vascular endothelial growth factor receptor*; W: Watt; ZNS: Zentrales Nervensystem; °C: Grad Celcius

1 Einleitung

1.1 Einführung

Zu Beginn der Arzneistoffentwicklung steht die Identifizierung eines biologischen *targets*, einer Zielstruktur für den möglichen Arzneistoff. Als biologische Zielstrukturen kommen verschiedene Angriffspunkte in der Zelle in Frage wie Proteine, DNA, RNA und Membranlipide. Proteine, vor allem Proteinkinasen, sind an wichtigen zellulären Vorgängen beteiligt und daher ein attraktives Ziel der Wirkstoffentwicklung. Proteinkinasen stellen eine große Gruppe strukturell verwandter Enzyme dar, die durch Phosphorylierung von spezifischen Aminosäuren eine Vielzahl von Substratproteinen aktivieren oder hemmen und dadurch verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Metabolismus, Apoptose sowie Genexpression beeinflussen. Neben den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind Proteinkinasen die zweitgrößte Gruppe von Wirkstofftargets mit circa 30% der Wirkstofffindungsprojekte in der pharmazeutischen Industrie.¹

In einem ersten *Screening*-Verfahren werden Strukturen ermittelt, die als Leitstrukturen fungieren. Die Leitsubstanz wird anschließend in einem Prozess aus Synthese, biologischer Testung, Bewertung und erneuter Synthese von modifizierten Verbindungen soweit optimiert, dass die Auswahl eines Wirkstoff-Kandidaten erfolgen kann, der sich für klinische Prüfungen eignet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Darstellung verschiedener neuartiger Kinase-Inhibitoren. Die Zielstrukturen sind verschiedene Proteinkinasen, die entsprechenden Leitstrukturen wurden aus der Literatur entnommen. Zunächst wird in der Einleitung auf die biologischen Grundlagen von Proteinkinasen wie Funktion und Aufbau eingegangen. Anschließend werden Therapieansätze und etablierte Proteinkinase-Inhibitoren näher erläutert.

1.2 Proteinkinasen: Schaltstellen in der Signaltransduktion

Eukaryotische Zellen sind fähig, auf wechselnde, extrazelluläre Signale aus ihrer Umgebung zu reagieren und miteinander zu kommunizieren, d.h. ihren Metabolismus entsprechend anzupassen. Extrazelluläre Signalstoffe wie Hormone, Neurotransmitter und Cytokine müssen erkannt, in eine zelluläre Antwort umgewandelt und ins Zellinnere weitergeleitet werden. Dabei kommt Proteinkinasen eine besondere Bedeutung zu, da sie die Signalweiterleitung in die Zelle vermitteln.

Im eukaryotischen Genom wurden nach vollendeter Sequenzierung 518 Proteinkinasen identifiziert. 1,7% aller Gene des menschlichen Genoms codieren für Kinasen.² Die Gesamtheit der Proteinkinasen wird in Anlehnung an das menschliche Genom auch Kinom genannt. 478 Proteinkinasen des menschlichen Kinoms werden als typische Kinasen bezeichnet, da sie in ihrer Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne große Homologie aufweisen. Die restlichen 40 Proteinkinasen, auch atypische Kinasen genannt, zeigen keinerlei Sequenzähnlichkeit, besitzen aber katalytische Aktivität.^{2, 3}

Proteinkinasen katalysieren die Übertragung von γ -Phosphat eines ATP-Moleküls auf die Hydroxylgruppen ihrer Substrate, um deren biologische Eigenschaften zu verändern. Je nach phosphoryliertem Aminosäurerest wird zwischen Serin-/Threonin- und Tyrosinkinasen unterschieden. Ferner gibt es die Gruppe der dualspezifischen Kinasen, die beide Gruppen von Aminosäureresten modifizieren können.

Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der zellulären Signaltransduktion, der an grundlegenden Vorgängen des menschlichen Körpers wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration und der Steuerung des programmierten Zelltods beteiligt ist.

In der Regel führt die Phosphorylierung eines Proteins zur Aktivierung, jedoch kann diese auch inaktivierend eingreifen oder neue Bindungsstellen generieren. Die Signaltransduktion ist häufig durch eine hierarchisch strukturierte Proteinkinasekaskade charakterisiert, d.h. eine aktivierte Proteinkinase phosphoryliert als Substrat eine untergeordnete Proteinkinase. Diese kann wiederum verschiedene Substrate phosphorylieren und so das Signal weiterleiten. Auf Grund des komplexen

Zusammenspiels der Phosphoryltransferasen auf molekularer Ebene scheint eine Regulation der Kinaseaktivität notwendig. Proteinphosphatasen sind die Gegenspieler der Proteinkinasen und katalysieren die Abspaltung der Phosphatgruppe.⁴

Welche verheerenden Auswirkungen eine Deregulation oder Mutation dieses komplexen Netzwerks haben kann, wird durch die Vielzahl der Erkrankungen deutlich, die mit Störungen der Funktion von Proteinkinasen einhergehen (Adipositas, rheumatoide Arthritis, kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen, Typ-I-Diabetes, Asthma, Psoriasis und diverse Krebserkrankungen).³

Wie oben beschrieben, lassen sich Proteinkinasen anhand ihrer Spezifität in Serin-/Threonin- und Tyrosinkinasen unterteilen. Die Tyrosinkinasen lassen je nach Lokalisation in der Zelle eine zweite Unterscheidung zu: rezeptorgebundene und nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinasen. Rezeptorgebundene Kinasen sind transmembranäre Proteine mit einer ligandgebundenen extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne, einer Juxtamembran-Domäne sowie einer katalytischen intrazellulären Kinase-Domäne und einem C-Terminus.³

Nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinasen hingegen befinden sich im Zytoplasma, im Nukleus oder liegen an der Plasmamembran assoziiert vor. Rezeptortyrosinkinasen aktivieren nach ligandeninduzierter Phosphorylierung von Tyrosylresten eine Reihe von Signalproteinen. Zu diesen gehören die MAP-Kinasen, die Phospholipase C und die PI3-Kinase.⁵ Die Gruppe der Serin-/Threoninkinasen ist an vielfältigen Signalkaskaden beteiligt.⁶

Knighton et al. konnten anhand der Kristallstrukturen von Proteinkinasen zeigen, dass Serin-/Threonin- sowie Tyrosinkinasen in ihrer katalytischen Domäne ähnlich aufgebaut sind.⁷ Alle Kinasen besitzen neben einer katalytischen Domäne, die Substrate phosphoryliert und ATP bindet, insgesamt große strukturelle Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur.

1.3 Aufbau der Proteinkinasen

1.3.1 Überblick der konformativen Änderungen

Die katalytische Einheit von Proteinkinasen kann allgemein in zwei strukturelle Bereiche unterteilt werden, in eine kleinere N-terminale Domäne, die neben der α C-Helix (α C) überwiegend aus β -Faltblättern aufgebaut ist, und einer größeren C-terminalen Domäne, die vorwiegend α -helikale Bereiche aufweist. N- und C-Terminus sind durch eine flexible, sogenannte Scharnierregion (*hinge region*) miteinander verbunden. Die *hinge region* fungiert wie ein Gelenk und wirkt maßgeblich an der Konformationsänderung der Kinase mit. Die Spalte zwischen N-terminalem und C-terminalem Bereich stellt das aktive Zentrum der Kinase dar. Die dort von der N-terminalen Domäne gebildete hydrophobe Tasche besitzt das Erkennungsmotiv für die Adenosin-Teilstruktur des ATP, das durch Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräfte daran gebunden wird. Die N-terminale Domäne besitzt die Glycin-reiche Schleife (*G-loop*) mit der hoch konservierten Sequenz G-X-G-X-X-G. Die Glycin-reiche Schleife ragt ins aktive Zentrum hinein und bindet die α - und β -Phosphorylgruppen des Cofaktors ATP. Ein konserviertes Lysin koordiniert die Ausrichtung des ATPs und geht eine Salzbrücke mit dem konservierten Glutamat der α C-Helix ein, wodurch eine für die Katalyse essentielle Konformation ausgebildet wird. Der Beginn der Aktivierungsschleife (*activation loop*) der C-terminalen Region ist durch die konservierte DFG-Sequenz (Asp-Phe-Gly) gekennzeichnet. Dieses Motiv fungiert unter anderem als Metallchelator, wobei das Aspartat direkte Wechselwirkungen mit den γ -Phosphatresten und dem Kofaktor Mg^{2+} eingeht (Abb.: 1-1).⁸

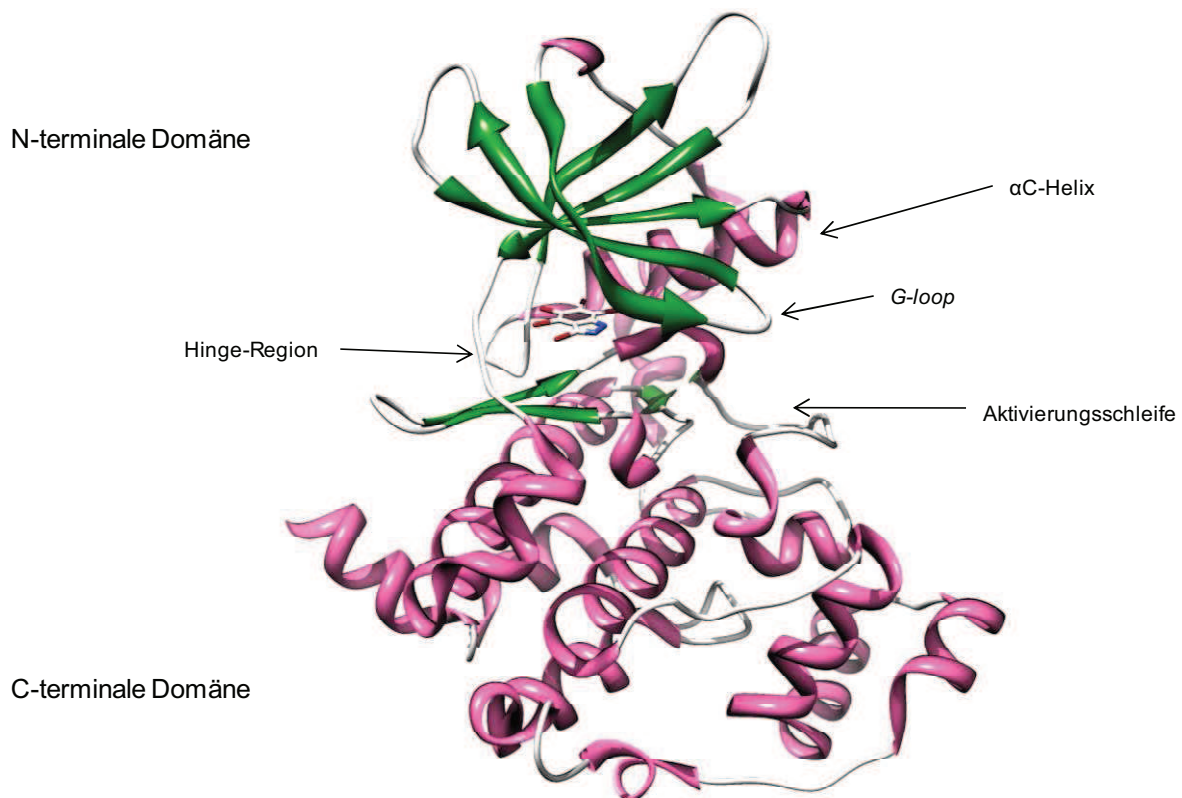


Abbildung 1-1: Aufbau der katalytischen Domäne der Proteinkinase CK2 mit einem ATP-kompetitiven Inhibitor (PDB-file: 3kxg)⁹; Visualisierung mit Chimera¹⁰

Der Zugang zu einer hydrophoben Tasche an der Rückwand der ATP-Bindetasche wird durch das invariante Lysin und den *gatekeeper* (gk) kontrolliert. Die Aminosäuren, die den *gatekeeper* darstellen, haben verschiedene Größen und bestimmen dadurch die Zugänglichkeit zur hydrophoben Tasche. Im Gegensatz zu den kleinen Aminosäuren Threonin oder Alanin versperren die großen Aminosäuren Phenylalanin, Leucin oder Methionin den Eingang zur hydrophoben Tasche. Der *gatekeeper* fungiert als Bezugspunkt für die Aminosäuren der *hinge region*, die entsprechend ihrer Position zu diesem Rest als gk+1 und gk+3 bezeichnet werden.¹¹

Bestandteil der C-terminalen Region ist neben der katalytischen Schleife (*catalytic loop*) mit der katalytischen Base Aspartat, die für die Ausrichtung des Substrats verantwortlich ist, das A-Segment. Dieses setzt sich aus dem DFG-Motiv, dem Rest der Aktivierungsschleife (*activation segment*) und der P+1-Schleife (*P+1 loop*) zusammen. Im aktiven Zustand adaptiert das A-Segment eine offene Konformation,

in der die Aktivierungsschleife vom katalytischen Zentrum weg zeigt, also die ATP-Bindestelle öffnet und damit die Substratbindung unterstützt. Im inaktiven Zustand versperrt die Aktivierungsschleife den Zugang zu den Bindestellen bzw. zum aktiven Zentrum.¹²

Die DFG-Konformation ist für die Kinaseaktivität wichtig. Im aktiven Zustand liegt eine DFG-in-Konformation vor, bei der die Seitenkette des Aspartats zur ATP-Bindungstasche orientiert ist und der aromatische Ring des Phenylalanins in die hintere Tasche zeigt. Dadurch besitzt dieser Phenylring direkten Kontakt zur α C-Helix. Während die DFG-in-Konformation wichtig für die Katalyse der aktiven Kinase ist, kann eine inaktive Kinase zwei weitere Konformationen einnehmen: DFG-out und DFG-out-like. In der DFG-out-Konformation erstreckt sich der aromatische Ring des Phenylalanins in die ATP-Bindungstasche und das Aspartat ist zur hinteren Tasche, von der Bindestelle weg, orientiert. Die DFG-out-like-Konformation ähnelt der DFG-out-Konformation, jedoch ist die Hauptkette näher an der α C-Helix positioniert.

Neben Änderungen im A-Segment lassen sich entscheidende Veränderungen der α C-Helix-Konformation zwischen inaktiver und aktiver Kinase beobachten. Die hochkonservierte α C-Helix stellt einen wichtigen Indikator für die konformationellen Änderungen im aktiven Zustand dar. Nur bei einer α C-in-Konformation wird die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem konservierten Lysin und einem konservierten Glutamat, das Bestandteil der α C-Helix ist, ermöglicht. Die dadurch stabilisierte α C-Helix-in-Konformation ist in Verbindung mit einer DFG-in-Konformation Voraussetzung für einen aktiven Zustand der Kinase. Demgegenüber handelt es sich um eine inaktive Kinase, wenn eine DFG-in/ α C-out-Konformation vorliegt.¹²

1.3.2 Aufbau der ATP-Bindetasche

Alle Kinasen zeigen große strukturelle Ähnlichkeiten in der hoch konservierten Bindungstasche für ATP. Aus diesem Grund galten Proteinkinasen für eine lange Zeit als *“nondruggable targets“*, also ungeeignete Angriffspunkte für die Arzneistoffentwicklung. Obwohl Kinasen große strukturelle Gemeinsamkeiten in der ATP-Bindungstasche aufweisen, besitzen sie spezifische Besonderheiten, die eine selektive Inhibition ermöglichen. Eine Möglichkeit zur Selektivitätserhöhung geht von

hydrophoben Seitentaschen in der Nachbarschaft der ATP-Bindestelle aus. Weiterhin können auch Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der *hinge region* und der Phosphat- und Zuckertasche zur Erzielung von Selektivität ausgenutzt werden.

Die ATP-Bindetasche befindet sich zwischen der N- und C-terminalen Schleife, die miteinander über die *hinge region* verbunden sind. Wie Abbildung 1-2 zeigt, ist die Bindetasche in fünf verschiedene Bereiche unterteilt. Von diesen werden die Adenin-, Zucker- und Phosphat-Region von ATP ausgefüllt und sind für dessen Bindung wichtig. Die Adenin-Teilstruktur des Cosubstrats ATP ist ein planares, heterocyclisches Ringsystem, das über drei Wasserstoffbrücken an die *hinge region* gebunden wird, wobei die Aminosäuren abwechselnd als Akzeptor-Donor-Akzeptor-Motiv für Wasserstoffbrücken fungieren. Zusätzlich werden weitere hydrophobe Wechselwirkungen zu Aminosäuren der C- und N-terminalen Region ausgebildet.

Die Zuckertasche ist überwiegend polar und bindet die Ribose-Teilstruktur des ATP-Moleküls über die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu einer der beiden Hydroxylgruppen des Riboserestes. Die Phosphattasche beinhaltet wichtige Sekundärstrukturen wie die Glycin-reiche Schleife, die α C-Helix und das DFG-Motiv. Diese hochkonservierten polaren Regionen gehören zum flexibelsten Teil der Kinasedomäne. Der Phosphatrest des Cofaktors ATP wird über eine Wasserstoffbrücke an das konservierte Lysin gebunden. Wegen der kinasespezifischen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Zucker- und Phosphattaschen bieten diese Bereiche die Möglichkeit, durch gezielte strukturelle Veränderungen der niedermolekularen Inhibitoren, Selektivität zu erreichen.

Die beiden Bereiche, die keine Wechselwirkung mit ATP eingehen, sind einerseits tief in der Kinase lokalisiert wie die hintere hydrophobe Tasche (*back pocket*) und andererseits zur Lösungsmittelseite gerichtet (*solvent accessible region*). Die lösungsmittelzugewandte Tasche flankiert den Eingang zur ATP-Bindetasche und unterscheidet sich in ihrer Konformation und Sequenz zwischen den einzelnen Kinasen. Die hydrophobe Tasche ist in Größe und Form ebenfalls äußerst variabel.¹³ Der Zugang wird durch das konservierte Lysin und die Größe des *gatekeeper* kontrolliert und trägt daher zur Selektivitätserhöhung von potentiellen Inhibitoren bei. Durch den Wechsel von der DFG-in- zur DFG-out-Konformation wird eine weitere

hydrophobe Tasche freigelegt, die ebenfalls zur Erzielung von Inhibitorselektivitäten genutzt werden kann.¹³

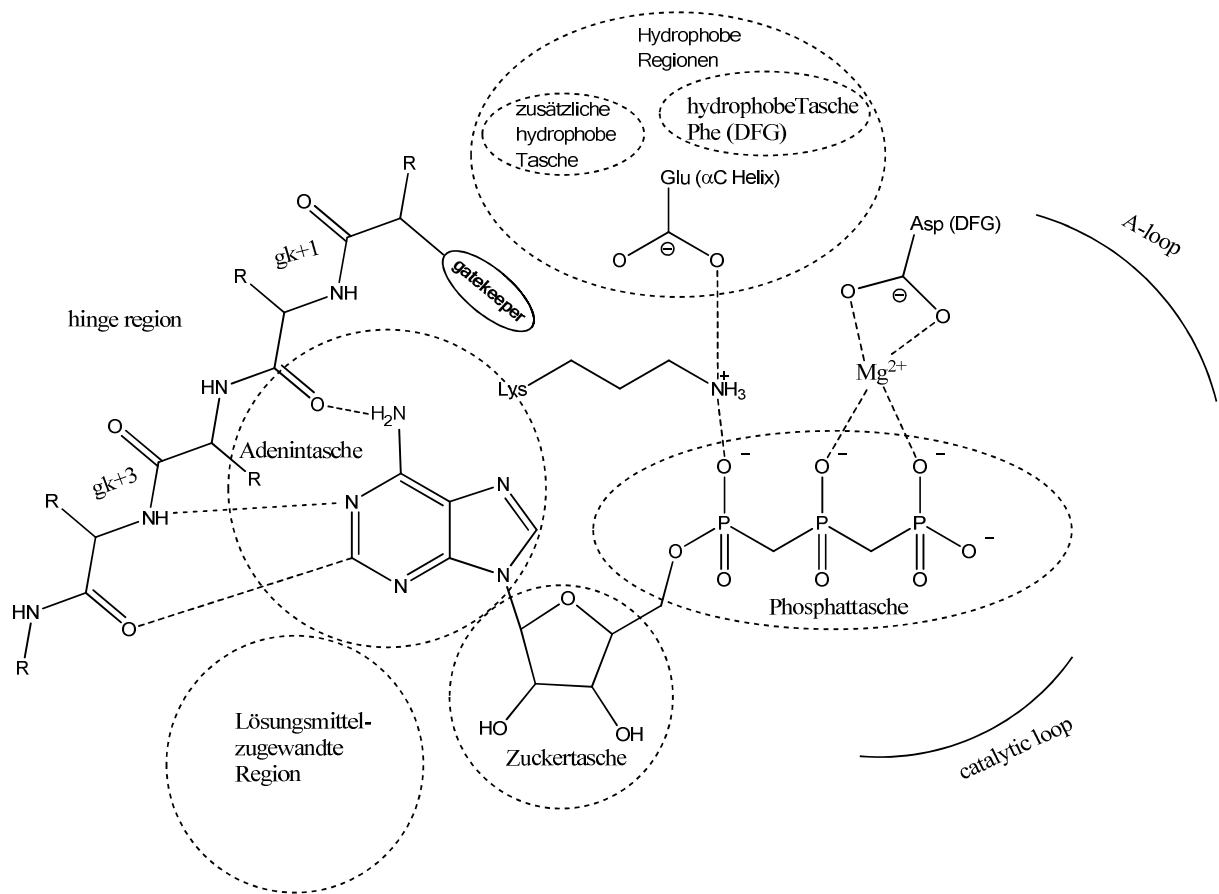


Abbildung 1-2: Zweidimensionale Darstellung der ATP-Bindetasche (modifiziert nach Vulpetti, Ghose und Schwartz)^{8, 11, 13}

1.4 Klassifizierung der Proteinkinasen

Eukaryotische Proteinkinasen können auf Grund von Sequenzähnlichkeiten in der Kinasedomäne in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die einzelnen Gruppen sind die CK1 (Casein kinase-1), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CDK-like), TKL (tyrosine kinase-like); AGC (PKA, PKG, PKC), CAMK (calmodulin-dependent kinases), STE und TK (Tyrosinkinasen).^{2, 14}

1.4.1 Rezeptortyrosinkinasen

VEGF-R (*vascular endothelial growth factor receptor*)

Die Neubildung von Gefäßen, die Angiogenese, ist essentiell für die Entwicklung solider Tumoren. Ab einem bestimmten Tumordurchmesser tritt ohne Angiogenese eine Unterversorgung des proliferierenden Gewebes ein. Die Vaskularisierung gewährleistet die Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen und ermöglicht so ein ungehindertes Wachstum. Zusätzlich werden von den Endothelzellen Wachstumsmediatoren freigesetzt, die das Tumorwachstum positiv beeinflussen können. Dazu gehören unter anderem: FGF (*fibroblast growth factor*), IL-8 (Interleukin-8), Angiogenin, PDGF (*platelet derived growth factor*), TGF (*transforming growth factor*) und TNF (*tumor necrosis factor*). Der Wachstumsfaktor VEGF besitzt Relevanz für die Entstehung diverser Erkrankungen wie Krebs, diabetischer Retinopathie, altersabhängiger Makuladegeneration, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Makropathie.¹⁵ Zur VEGF-Familie gehören die Faktoren VEGFA-F und PlGF (*placental growth factor*). Diese Faktoren binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptortyrosinkinasen (VEGF-R1-3). Durch die Bindung des Faktors an die extrazelluläre Domäne dimerisiert der Rezeptor und es kommt in der Folge zur Aktivierung verschiedener Signalwege durch Autophosphorylierung.

Eine Hemmung des VEGF-induzierten Angiogenesesignals sollte selektiv die tumor-assoziierten Blutgefäße beeinflussen. Der VEGF-Rezeptor stellt ein wichtiges Ziel in der antiangiogenen Therapie dar, weil dessen Überexpression mit schlechter Prognose bei bösartigen Erkrankungen verbunden wird.^{16, 17}

Die zielgerichtete Unterbrechung des VEGF/VEGF-R-Systems stellt ein attraktives Ziel in der Entwicklung neuer Therapeutika dar, was sich in der Zahl der entwickelten Wirkstoffe widerspiegelt. Neben dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Novartis) werden die niedermolekularen Inhibitoren Sorafenib (Nexavar®, Bayer Schering Pharma AG) und Sunitinib (Sutent®, Pfizer) in der Therapie eingesetzt. Darüber hinaus befinden sich zahlreiche weitere synthetische Hemmstoffe und *Biologicals* in der klinischen Prüfung.¹⁸ Nähere Ausführungen zu den Wirkstoffen sind dem Kapitel 1.5 zu entnehmen.

1.4.2 Serin-/Threoninkinasen

PLK (*polo-like kinase*)

Zur Familie der Polo-like Kinasen aus der Gruppe der Serin-/Threoninkinasen gehören PLK1, PLK2 (SNK, *serum-inducible kinase*), PLK3 (FNK, *FGF-inducible kinase*; PRK, *proliferation-related kinase*; CNK, *cytokine-inducible kinase*), PLK4 (SAK, *Snk akin kinase*) und PLK5. Obwohl alle Vertreter in die Regulation der Mitose involviert sind, nimmt PLK1 als bestcharakterisiertes Mitglied dieser Familie eine Sonderstellung ein, da diese essentiell für die klassischen mitotischen Funktionen ist. Über die Aktivität von PLK2-5 ist weniger bekannt.¹⁹

Die PLK1-Expression ist abhängig von der Zellzyklusphase. Am Anfang der G1-Phase ist die PLK1-Konzentration niedrig und steigt während des Zellzyklus an. In der G2/M-Phase ist ein Maximum an PLK1 erreicht. PLK1 reguliert zu Beginn der Mitose die G2/M-Transition durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25C, das seinerseits den Cdk1-Cyclin-B-Komplex aktiviert. Weiterhin ist PLK1 im Zellzyklus an der Bildung eines bipolaren Spindelapparates beteiligt. In der G2-Phase ist PLK1 am Zentrosom lokalisiert und trägt erheblich zu dessen Reifung und Teilung sowie der Steuerung der Mikrotubulianordnung bei. Verschiedene Proteine werden in diesem Zusammenhang für die Zentrosomenreifung von PLK1 rekrutiert. Während der Zellteilung ist PLK1 in der Prometaphase an den Kinetochoren der chromosomalen Zentromere lokalisiert. Die Akkumulation an den Kinetochoren bewirkt eine Phosphorylierung von Kontrollpunktmediatoren, was eine Befestigung der Mikrotubuli an den Spindelapparat begünstigt. Nach Aufhebung des Kontrollpunktsignals kann durch PLK1 die Aktivierung des Cyclosoms (APC/C) erfolgen. Das Cyclosom ist ein Enzymkomplex aus der Familie der Ubiquitinligasen, das im Rahmen des Mitoseabschlusses mitotische Proteine für den proteasomalen Abbau markiert. Entscheidend ist die Markierung von Kohesin durch Phosphorylierung, da dieser Prozess für die korrekte Trennung der Schwesterchromatiden erforderlich ist und dabei zur Initiation der Anaphase führt. In der Zytokinese ist das Enzym an Mikrotubuli-stabilisierenden Funktionen beteiligt.¹⁹⁻²¹

Diese Darstellung der verschiedenen Aufgaben von PLK1 in der Mitose machen deutlich, dass gerade in Geweben mit hoher mitotischer Aktivität PLK1 überexprimiert wird. Betroffene Gewebe sind dabei Tumorgewebe, da Tumor-

wachstum in der Regel mit einer unkontrollierten Teilung entarteter Zellen einhergeht. Bekannte PLK1-induzierte Karzinome sind Ovarial- bzw. Endometriumkarzinome, nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Brust- und Dickdarmkarzinome, Oro- und Pharynxkarzinome und Melanome. PLK1 bindet an den Tumorsuppressor p53 und hemmt dessen proapoptotische Aktivität.²² Da eine PLK1-Überexpression ein Maß für die Aggressivität eines Tumors darstellt, bedeutet dieser Befund eine schlechte Prognose für die betroffenen Krebspatienten.^{23, 24}

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden in den letzten Jahren ATP-kompetitive PLK1-Inhibitoren als potentielle Tumorthapeutika entwickelt (Abb.: 1-3). Das Dihydropterinon-Derivat BI 2536 (Boehringer Ingelheim, **1**) ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor und besitzt einen hohen Grad an Selektivität für die PLK Familie. PLK1 wird mit einem IC_{50} -Wert von 0.83 nM, PLK2 mit 3.5 nM und PLK3 mit einem IC_{50} von 9.0 nM inhibiert. **1** befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung für verschiedene Tumorerkrankungen wie unter anderem Brustkrebs und Leukämie. Auch das Dihydropyrazolochinazolin-Derivat NMS-P937 (Bayer Schering AG, **2**) ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor. **2** beeinflusst außerhalb der PLK Familie keine weiteren Kinasen. PLK1 wird in vitro mit einem IC_{50} -Wert von 0.02 nM gehemmt. Außerdem zeigt **2** antiproliferative Aktivität gegenüber PLK2 mit einem IC_{50} von 10 nM und PLK3 mit 3.2 nM. NMS-P937 befindet sich zurzeit in Phase I der klinischen Prüfung.^{20, 25-27}

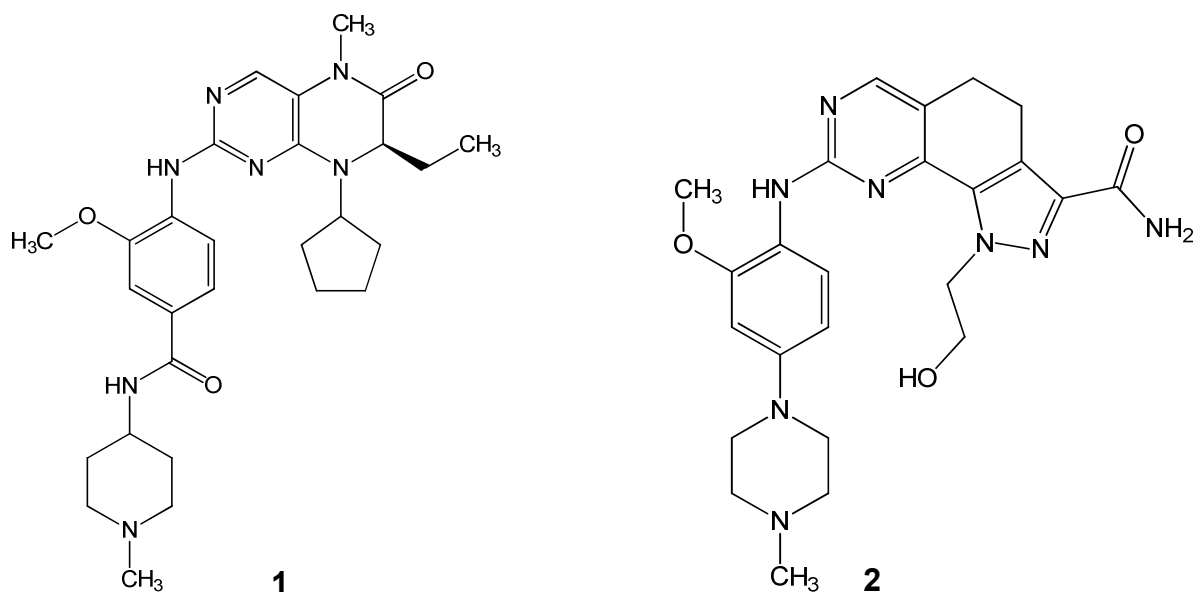


Abbildung 1-3: PLK1-Inhibitoren BI 2536 (**1**) und NMS-P937 (**2**)

CK2

Die Proteinkinase CK2 ist eine multifunktionale Serin-/Threoninkinase. Das Enzym liegt in der Zelle überwiegend als heterotetrameres Holoenzym vor, das aus zwei katalytischen α - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten besteht. CK2 ist nachweislich an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Genexpression, Zellteilung und -proliferation beteiligt. Verschiedene pathologische Prozesse wie Entzündungen, Infektionen und die Tumorentstehung werden mit CK2 in Verbindung gebracht. Es konnte unter anderem eine erhöhte CK2-Expression in Tumoren wie Prostata-, Lungenkrebs und der akuten myeloischen Leukämie beobachtet werden. Daher wird CK2 als prognostischer Faktor in der Onkologie herangezogen. CK2 wirkt antiapoptotisch und stimulierend auf einzelne Prozesse des Zellzyklus.²⁸ Obwohl CK2 hauptsächlich im Cytoplasma gelöst ist, kommt es auch assoziiert an der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, dem Endoplasmatischen Reticulum und den Ribosomen vor. Bedingt durch ubiquitäres Vorkommen, breite Substratdiversität und unterschiedliche Lokalisation ist CK2 an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt.²⁹

Eine Besonderheit von CK2 ist die Fähigkeit, ATP und GTP als Phosphatgruppendonator zur Substratphosphorylierung benutzen zu können.³⁰ Wegen raumerfüllender Aminosäuren am Eingang zur ATP-Bindetasche ist diese bei CK2 kleiner als bei den meisten anderen Proteinkinasen. So zeigt der ansonsten unselektive Inhibitor Staurosporin (**24**, s.S. 30) als relativ großes Molekül nur sehr schwache Hemmaktivität bei CK2.³¹ Die Suche nach CK2-Inhibitoren führte in den späten 1980er Jahren zu ATP-kompetitiven mehrfach halogenierten Benzimidazol-Derivaten. Exemplarisch für diese Stoffklasse wird in Abbildung 1-4 das 4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol (TBB, **3**) als aktiver und selektiver, zellgängiger Inhibitor von CK2 abgebildet. Der IC_{50} -Wert für CK2 liegt bei 0.5 μM .^{28,32}

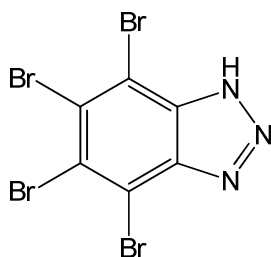


Abbildung 1-4: 4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol (**3**)

CDK (*cyclin-dependent kinase*)

Cyclin-abhängige Kinasen gehören zur Gruppe der Serin-/Threoninkinasen und spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus. Die enzymatische Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen hängt von der Präsenz des regulatorischen Partners Cyclin ab, dessen Konzentration durch die verschiedenen Zellzyklusphasen kontrolliert wird. Durch die nicht-kovalente Bindung eines Cyclins als regulatorische Untereinheit werden Änderungen in der CDK-Struktur induziert, die die Kinasen in eine aktive Konformation versetzen. Verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe sind in spezifischen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-, M-Phase) aktiv.

CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D und CDK6/Cyclin D steuern überwiegend den G1/S-Übergang, Hauptsubstrat ist dabei das Retinoblastoma-Protein (pRb). Die sich anschließende S-Phase und der Beginn der G2-Phase werden durch CDK2/Cyclin A kontrolliert. Nach einem Anstieg der Cyclin B-Konzentration wird der CDK1/Cyclin B-Komplex gebildet, dessen Aktivierung für den Ablauf der G2-Phase, der G2/M-Transition und der Mitose notwendig ist. Nicht alle Mitglieder der CDK-Familie sind in der Zellzyklus-Kontrolle involviert. CDK2/Cyclin E spielt ferner eine Rolle in der Genregulation und im p53-vermittelten Apoptosesignalweg. Die CDKs 7, 8, 9 und 11 sind an der Transkription beteiligt und CDK5 kommen Aufgaben im Nervensystem zu. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der CDK-Familie wird CDK5 von p35, p39 und deren Spaltprodukten p25 und p29 aktiviert.³³

Fehlregulationen wie die Inaktivierung endogener CDK-Inhibitoren (KIP- und INK4-Familien), die Überexpression der Cycline D und E oder konstitutive Aktivierung von CDK4 sind häufige Faktoren für die Ausbildung verschiedener Tumore. Da CDKs an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt sind, werden Störungen in der Aktivität und Regulation mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Virusinfektionen sowie proliferative Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht.³³⁻³⁶

CDKs stellen auf Grund ihrer Rolle im Zellzyklus ein attraktives Ziel für die Suche nach potentiellen Tumorthapeutika dar. Verschiedene CDK-Inhibitoren wurden identifiziert, die trotz unterschiedlicher Strukturen Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie sind ATP-kompetitive, flache Heterozyklen mit geringem Molekulargewicht. Flavopiridol (Alvocidip, Sanofi-Aventis, **4**) ist ein semisynthetisch hergestellter,

unselektiver CDK-Inhibitor und greift in der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus ein. Zurzeit befindet sich **4** in der klinischen Prüfung für den Einsatz gegen verschiedene Arten von Krebs.³⁷

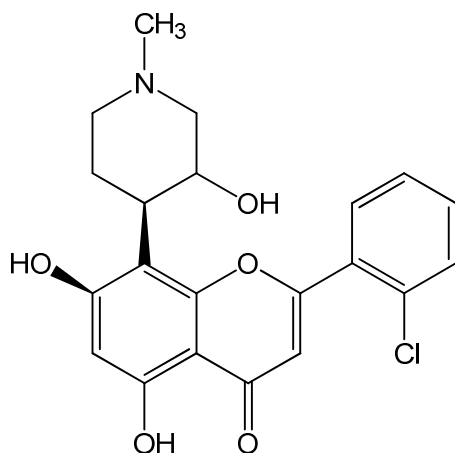
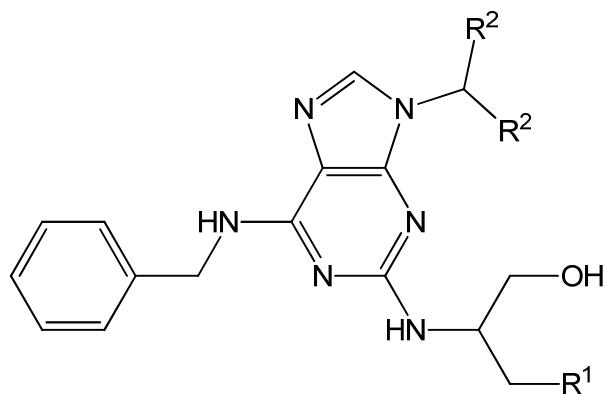
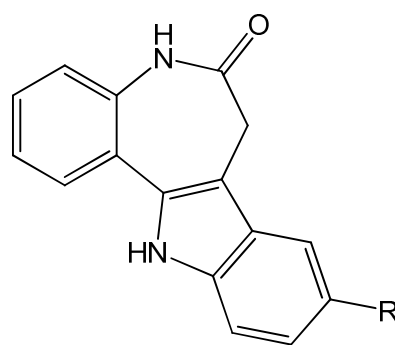


Abbildung 1-5: Flavopiridol (**4**)

Weitere CDK-Inhibitoren wie Roscovitin (**5**) und Olomoucine (**6**) zeigen eine moderate Aktivität im mikromolaren Bereich und mäßige Selektivität. Auch in der Klasse der Paullone, die durch ein Indolobenzazepinon-Grundgerüst gekennzeichnet sind, finden sich CDK-Inhibitoren (Abb.: 1-6).³⁸



Roscovitin (**5**) $R^1 = C_2H_5$, $R^2 = CH_3$
 Olomoucine (**6**) $R^1 = H$, $R^2 = H$



Kenpaullone (**7**) $R = Br$
 Alsterpaullone (**8**) $R = NO_2$

Abbildung 1-6: Struktur von CDK-Inhibitoren

Im Andenken an Dr. Ken Paull erhielt die Substanzklasse der Paullone ihren Namen. Dr. Paull arbeitete am *National Cancer Institute* (NCI) der Vereinigten Staaten und hat den COMPARE-Algorithmus des *Human Tumor Cell Line Screening* mit

entwickelt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde das Kenpaullon (**7**) als CDK-Inhibitor entdeckt. Das Alsterpaullon (**8**) wurde in präklinischen Studien als Antitumorwirkstoff geprüft. Beide Paullone zeigen Aktivität gegenüber CDKs im nanomolaren Bereich.³⁹

GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3)

Die Glycogen Synthase Kinase-3 ist eine Serin-/Threoninkinase, die in zwei Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β , vorliegt. Das Enzym besitzt nahe Verwandtschaft zu den Cyclin-abhängigen Kinasen und gehört wie diese zu der Gruppe der CMGC der eukaryotischen Proteinkinasen.^{2, 40} Die Isoformen werden von unterschiedlichen Genen kodiert, weisen aber in ihrer Kinasedomäne eine 97%ige Homologie auf. Das GSK-3 α -Protein besitzt am N-Terminus eine Glycin-reiche Domäne, die der GSK-3 β fehlt. Trotz struktureller Ähnlichkeiten besitzen beide Isoformen unterschiedliche Funktionen im physiologischen System.⁴¹

GSK-3 phosphoryliert Substrate mit einer Konsensussequenz Ser/Thr-X-X-X-Ser(P)/Thr(P). Die erste Ser/Thr-Gruppe stellt die Phosphorylierungsstelle für die GSK-3 dar. X kann jede beliebige Aminosäure sein, wobei Prolin bevorzugt wird. Das C-terminale Ser/Thr wurde schon vorphosphoryliert (P). Beide Isoformen sind in Säugetierzellen konstitutiv aktiv, was eine Initiator-Phosphorylierung durch eine andere Kinase am C-Terminus der Konsensussequenz voraussetzt.⁴¹

Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase durch GSK-3 β . Die Glykogen-Synthase wird erst zu einem Substrat für die Isoform GSK-3 β , nachdem diese von der Proteinkinase CK2 innerhalb der Erkennungssequenz vorphosphoryliert wurde. Diese primäre Phosphorylierung stellt eine Erkennungsstelle für GSK-3 β dar. Anschließend phosphoryliert die GSK-3 β vier Serinreste der Glykogen-Synthase und hemmt so deren Aktivität. Der Blutglucosespiegel steigt an, Insulin wird freigesetzt und an seinen Rezeptor gebunden. Im Folgenden wird eine Signalkaskade initiiert, an deren Ende GSK-3 von Akt/PKB an spezifischen Serinresten (GSK-3 α : Ser21, GSK-3 β : Ser9) phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird.⁴² Dies führt zur vermehrten Glycogenbildung, wodurch der Blutglucosespiegel sinkt.^{43, 44}

Die GSK-3 ist eine multifunktionelle Kinase, die an verschiedenen zellulären Signalwegen beteiligt ist. Neben dem Insulinsignalweg spielt GSK-3 eine bedeutende

Rolle im Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Über diesen Signalweg werden im Säugetier Wachstum und Differenzierung embryonaler und adulter Gewebe reguliert. Im Wnt-Signalweg liegt GSK-3 mit β -Catenin, Axin und dem APC-Protein in einem Multiproteinkomplex vor. Die Konzentration des β -Catenin-Proteins wird durch Phosphorylierung durch die GSK-3 und Komplexbildung der genannten Proteine beeinflusst. Reichert sich β -Catenin im Zytosol und im Zellkern an, kann dieses an Transkriptionsfaktoren binden und spezifische Gene exprimieren, die wichtig für die Zellteilung sind.⁴³

GSK-3 wird mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung soll GSK-3 die Tau-Phosphorylierung, die Amyloid- β -Bildung sowie die Amyloid- β -induzierte Neurotoxizität beeinflussen.⁴⁵ Die Verflechtung von GSK-3 mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen machte dieses Enzym zu einem interessanten Zielprotein der Wirkstoffforschung vor allem im Bereich der Tumorthherapie. GSK-3 β wird direkt mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Abhängig von der Tumorart fungiert GSK-3 β als Wachstumsverstärker oder als Wachstumsunterdrücker verschiedener Krebsarten.^{46, 47}

Literaturbekannte ATP-kompetitive GSK-3-Inhibitoren sind unter anderem die Maleinimide wie SB-216763 (**9**) mit einem IC_{50} -Wert von 34 nM,⁴⁸ die Paullone wie das Alsterpaullon (**8**) mit einem IC_{50} -Wert für GSK-3 β von 4 nM⁴⁹ oder aus der Gruppe der Indigoide das Indirubin-3'-monoxim (**10**) mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich.⁵⁰

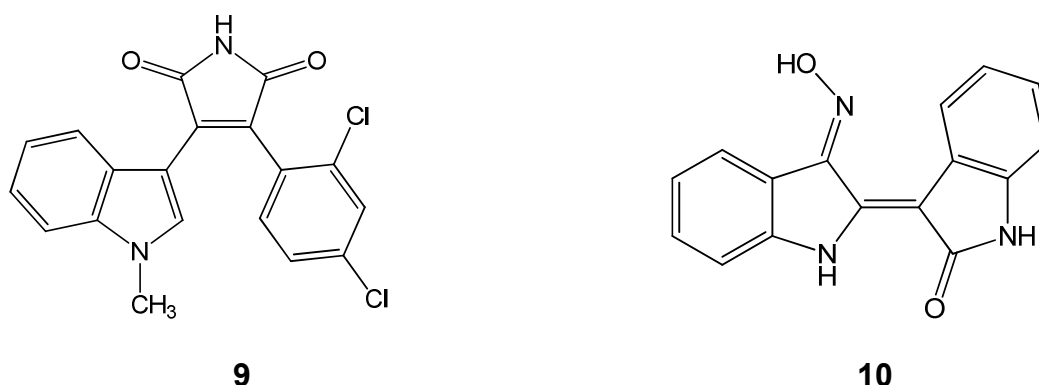


Abbildung 1-7: GSK-3-Inhibitoren SB-216763 (**9**) und Indirubin-3'monoxim (**10**)

1.5 Therapieoptionen

Fehlreguliertes Zellwachstum ist ein Merkmal für Tumorerkrankungen, das häufig durch gestörte Signalvermittlung innerhalb einer Zelle oder zwischen Zellen bedingt ist. Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in dieser Signaltransduktion und korrelieren bei Fehlfunktion direkt mit pathologischem tumorassozierten Zellwachstum. Daher hat sich die zielgerichtete Inhibition von Proteinkinasen als eine vielversprechende Strategie in der Krebsbehandlung entwickelt. Ferner verspricht diese Option im Idealfall eine Verbesserung der Wirksamkeit ohne die toxischen Nebenwirkungen der etablierten Chemotherapeutika. Nachstehend sollen verschiedene therapeutische Ansätze dargestellt werden.

1.5.1 Inhibition der katalytischen Domäne

Im Folgenden wird die gezielte Inhibition der enzymatischen Aktivität von tumorrelevanten Kinasen beschrieben. Dabei soll das Augenmerk auf die ATP-Bindestelle gerichtet und die verschiedenen Möglichkeiten der Hemmung aufgelistet werden.

Da die Aminosäuresequenz der Kinasedomäne hoch konserviert ist, weisen Inhibitoren oftmals eine geringe Selektivität auf. Basierend auf der Tatsache, dass Tumorerkrankungen ein komplexes System aus verschiedenen deregulierten Proteinkinasen darstellen, scheint die Entwicklung von Multikinase-Inhibitoren, die gleichzeitig mehrere pathologisch relevante Proteine ausschalten, eine erfolgversprechende Strategie zu sein. Viele zelluläre Prozesse in der Signaltransduktion beruhen auf der Aktivierung hintereinander geschalteter Kinasen, weshalb eine selektive Hemmung einer einzelnen Kinase häufig keine Vorteile mit sich bringt und Multikinase-Inhibitoren überlegen sind. Gründe für den Einsatz von Multikinase-Inhibitoren in der Krebstherapie können Resistenzbildungen durch Mutationen des Zielproteins, durch Aktivierung redundanter Kinasen oder durch mögliche Inaktivierungen von Phosphatasen sein. Die Herausforderung in der Tumorthherapie ist somit die gezielte Entwicklung von Kinaseinhibitoren mit spezifischem Wirkprofil, vor allem im Hinblick auf die Wirkstoffresistenz in der Langzeittherapie. Dabei wird ein Ausgleich zwischen Multikinase-Inhibition und selektiver Auswahl der zu inhibierenden Kinasen angestrebt.⁵¹⁻⁵³

Die derzeit zugelassenen Proteinkinase-Inhibitoren sind niedermolekulare, ATP-kompetitive Moleküle, die in die ATP-Bindestelle von Kinasen binden und somit mit dem physiologischen Substrat oder Cosubstrat konkurrieren.

Klassifizierung von Proteinkinase-Inhibitoren

Typ-I-Inhibitoren bilden zurzeit die größte Gruppe der zugelassenen Kinaseinhibitoren. Diese binden ähnlich dem Adeninrest des ATPs in die ATP-Bindetasche und bilden bis zu drei Wasserstoffbrücken zu dem *backbone* der *hinge region* aus. Typ-I-Inhibitoren erkennen die enzymatisch aktive DFG-in-Konformation, binden aber auch an die inaktive DFG-in-/ α C-Helix-out-Konformation. Typ-I-Inhibitoren stehen auf Grund der hohen ATP-Konzentration (1-4 mM)⁸ in der Zelle mit ATP in großer Konkurrenz (ATP-kompetitiv). Dies trifft vor allem auf Kinasen zu, die einen relativ kleinen K_M -Wert (5-200 μ M) für ATP aufweisen. Auf Grund des hohen Grades an Struktur- und Sequenzhomologie der ATP-Bindungstasche kommt es bei Typ-I-Inhibitoren häufig zu Kreuzreaktionen und dadurch zu unerwarteten Nebenwirkungen und Toxizität.

Die zweite Generation der Kinaseinhibitoren wurde eher zufällig entdeckt. Die Gruppe der Typ-II-Inhibitoren verhält sich ebenfalls ATP-kompetitiv, unterscheidet sich aber in ihrem Bindungsmodus von Typ-I-Inhibitoren. Typ-II-Inhibitoren binden und stabilisieren die inaktive DFG-out-Konformation von Proteinkinasen. Dabei befindet sich das DFG-Motiv in einer auswärts gerichteten Konformation und setzt eine hydrophobe Tasche frei, die eine allosterische Bindung zusätzlich zur Adenin-Region ermöglicht. Häufig werden weitere Wasserstoffbrückenbindungen zum Glutamat der α C-Helix und zum Aspartat des DFG-*backbone* ausgebildet.

Die Beweglichkeit des DFG-Motivs in der DFG-out-Konformation und die Varianz der Aminosäuren in der allosterischen Tasche bieten Möglichkeiten für die Entwicklung selektiver Kinaseinhibitoren, sind aber gleichzeitig Angriffspunkt für verschiedene Mutationen. Diese beeinflussen die Aktivität der Inhibitoren negativ und führen zu Resistenzen.

Typ-II-Inhibitoren erreichen eine höhere Selektivität einerseits dadurch, dass nicht alle Kinasen in der Lage sind, eine hydrophobe Tasche auszubilden. Andererseits sind bei dieser Inhibitor-Klasse Wasserstoffbrückenbindungen zur *hinge region* nicht unbedingt für die Bindung notwendig.⁵⁴ Ungünstig ist bei vielen Typ-II-Inhibitoren ein relativ hohes Molekulargewicht, das die Penetration durch Membranen erschwert.

Eine weitere Klasse von Kinaseinhibitoren stellen die Typ-I½-Inhibitoren dar. Sie bilden ähnlich wie Typ-II-Inhibitoren Wechselwirkungen mit der α C-Helix und dem DFG-Motiv aus, binden aber spezifisch wie Typ-I-Inhibitoren an die DFG-in-Konformation. Dabei kann entweder eine DFG-in, α C-in- oder DFG-in, α C-out-Konformation vorliegen. Typ-I½-Inhibitoren stellen eine Zwischenklasse der schon bekannten Inhibitortypen dar. Sie erreichen eine Selektivitätserhöhung im Vergleich zu Typ-I-Inhibitoren und umgehen den Mechanismus der Resistenzentwicklung, der für Typ-II-Inhibitoren charakteristisch ist.⁵⁵

Die Typ-II-Inhibitoren werden in der Literatur häufig als allosterische Inhibitoren bezeichnet.⁵¹ Diese Einordnung erscheint allerdings problematisch, da definitionsgemäß allosterische Inhibitoren nicht ATP-kompetitiv sind und an eine andere Stelle als das aktive Zentrum binden.

“Echte“ allosterische Inhibitoren bilden vielmehr die dritte Gruppe der Inhibitoren. Typ-III-Inhibitoren sind nicht ATP-kompetitiv und binden in einiger Entfernung zum aktiven Zentrum an einer allosterischen Bindungsstelle und bewirken dadurch eine Konformationsänderung. Dies führt zu einer Aktivitätsminderung der Kinase. Sie adressieren nicht die *hinge region* und besitzen angesichts dessen die höchste Selektivität.^{54, 56}

Die beschriebenen Inhibitoren beruhen auf einer reversiblen Hemmung der Proteinkinasen. Daneben existieren kovalent bindende, irreversible Inhibitoren. Sie besitzen zusätzlich eine elektrophile Position in ihrem Molekül-Gerüst und können auf diese Weise nukleophile Aminosäureseitenketten (z.B. Cystein) alkylieren. Dadurch sind diese Inhibitoren fähig, Proteinkinasen als Zielstrukturen irreversibel zu inaktivieren.⁵⁷

Etablierte niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren

2001 wurde Imatinib (**11**) (Glivec[®], Novartis) als erster niedermolekularer Proteinkinase-Inhibitor zugelassen. Imatinib wird zur Behandlung der Philadelphia-Chromosom-positiven Chronischen Myeloischen Leukämie (Ph⁺-CML) eingesetzt. CML ist eine Erkrankung, bei der häufig eine Chromosomenaberration festgestellt wird. Es kommt zu einer spezifischen, reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 9. Die betroffenen Gensequenzen sind für das Chromosom 9 das *c-abl* (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog*)-Gen und für das Chromosom 22 das *bcr* (*breakpoint cluster region*)-Gen. Das nach Translokation entstandene *abl-bcr*-Gen kodiert anschließend für das Fusionsprotein BCR-ABL. Diese konstitutiv aktive Tyrosinkinase induziert die Proliferation der myeloischen Zellen.⁵⁸

Die Wirkweise von Imatinib führt zur Apoptose der Philadelphia-Chromosom-positiven Zellen. Im Verlauf der Entwicklung von Imatinib wurde entdeckt, dass die Verbindung auch die Kinase c-Kit hemmt, die bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) überexprimiert ist.⁵⁹ Imatinib wurde nach positiver Studienlage zusätzlich für die Behandlung von nichtresezierbaren, metastasierenden GIST zugelassen. Ferner inhibiert Imatinib PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*).⁵⁹ Aktivierte PDGF-Rezeptoren können zur Stimulierung von Zellwachstum, -migration und Apoptose führen. Überaktivität des Rezeptors führt unter anderem zu Dermatofibrosarcoma protuberans, einem aggressiven, infiltrativ wachsenden Tumor des Subkutangewebes. Auch hier ist eine Behandlung mit Imatinib im Rahmen von klinischen Studien möglich.⁶⁰

Bei einem kleinen Anteil der CML-Patienten zeigt die Imatinib-Behandlung keine Besserung oder verliert ihre Wirkung. Dieses ist häufig auf spezielle Veränderungen des BCR-ABL-Proteins zurückzuführen. Die erste Imatinib-Resistenz konnte auf eine BCR-ABL-*gatekeeper*-Mutation zurückgeführt werden, bei der die Aminosäure Threonin durch Isoleucin ausgetauscht wurde. Mittlerweile sind über 50 verschiedene Punktmutationen bekannt, die die katalytische Domäne oder den *activation loop* betreffen.⁸ Während Mutationen in der ATP-Bindetasche direkt die Bindung von Imatinib behindern, kommt es bei Mutationen im *activation loop* zur Stabilisierung der aktiven Konformation. Diese Art der Mutation verhindert die Ausbildung der inaktiven

Konformation, die für die Bindung von Imatinib essentiell ist. Sowohl der beeindruckende therapeutische Erfolg als auch die Probleme mit Resistenzentwicklungen stimulierten die Suche nach innovativen niedermolekularen Proteinkinase-Inhibitoren.⁵¹ Daraus resultieren neue Arzneistoffe, von denen aktuell die Tyrosinkinasehemmer Dasatinib (**12**) und Nilotinib (**13**) zur Verfügung stehen.⁶¹

Dasatinib (**12**) (Sprycel®, Bristol-Meyers Squibb) wurde 2006 als weiterer Proteinkinase-Inhibitor für die Behandlung der CML (Ph+) zugelassen. Im Vergleich zu Imatinib besitzt Dasatinib einen geänderten Wirkmechanismus. Da die Substanz an die aktive Konformation der BCR-ABL-Kinase bindet, ist auch die Inhibition von Imatinib-resistenten Mutanten möglich. Dasatinib ist ein unselektiver Proteinkinase-Inhibitor und hemmt zusätzlich die Kinasen SRC, PDGFR und c-KIT.⁶²

Eine weitere Therapieoption gegen CML (Ph+) in der chronischen oder akzelerierten Phase steht mit dem 2007 eingeführten Kinase-Inhibitor Nilotinib (**13**) (Tasigna®, Novartis) zur Verfügung.⁶³ Zwar bindet Nilotinib wie Imatinib an die DFG-out-Konformation der Kinasen, weist aber eine deutlich höhere Affinität auf. Daher sind auch verschiedene Imatinib-resistente BCR-ABL-Mutanten noch durch Nilotinib hemmbar.⁶⁴

Mutationen werden auch in anderen Kinasen beobachtet. Beispielsweise konnten bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) somatische Mutationen in der ATP-Bindungsstelle des EGFR-Gens gefunden werden. Veränderungen in diesem Genabschnitt bewirken eine ligandenunabhängige Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität und damit eine verstärkte Signaltransduktion, die unter anderem das Zellwachstum und die Zellproliferation betreffen.

Mit Gefitinib (**14**) (Iressa®, AstraZeneca) wurde 2003 der erste EGFR-Inhibitor für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierenden NSCLC in der Monotherapie zugelassen, wenn schon Chemotherapien angewendet wurden. Auf Grund schlechter Studienergebnisse in der durchgeführten ISEL-Studie (*Iressa® survival evaluation in lung cancer*) wurde die Zulassung von Gefitinib eingeschränkt auf Patienten, die sich bereits in klinischen Studien befanden oder von der Therapie profitierten.

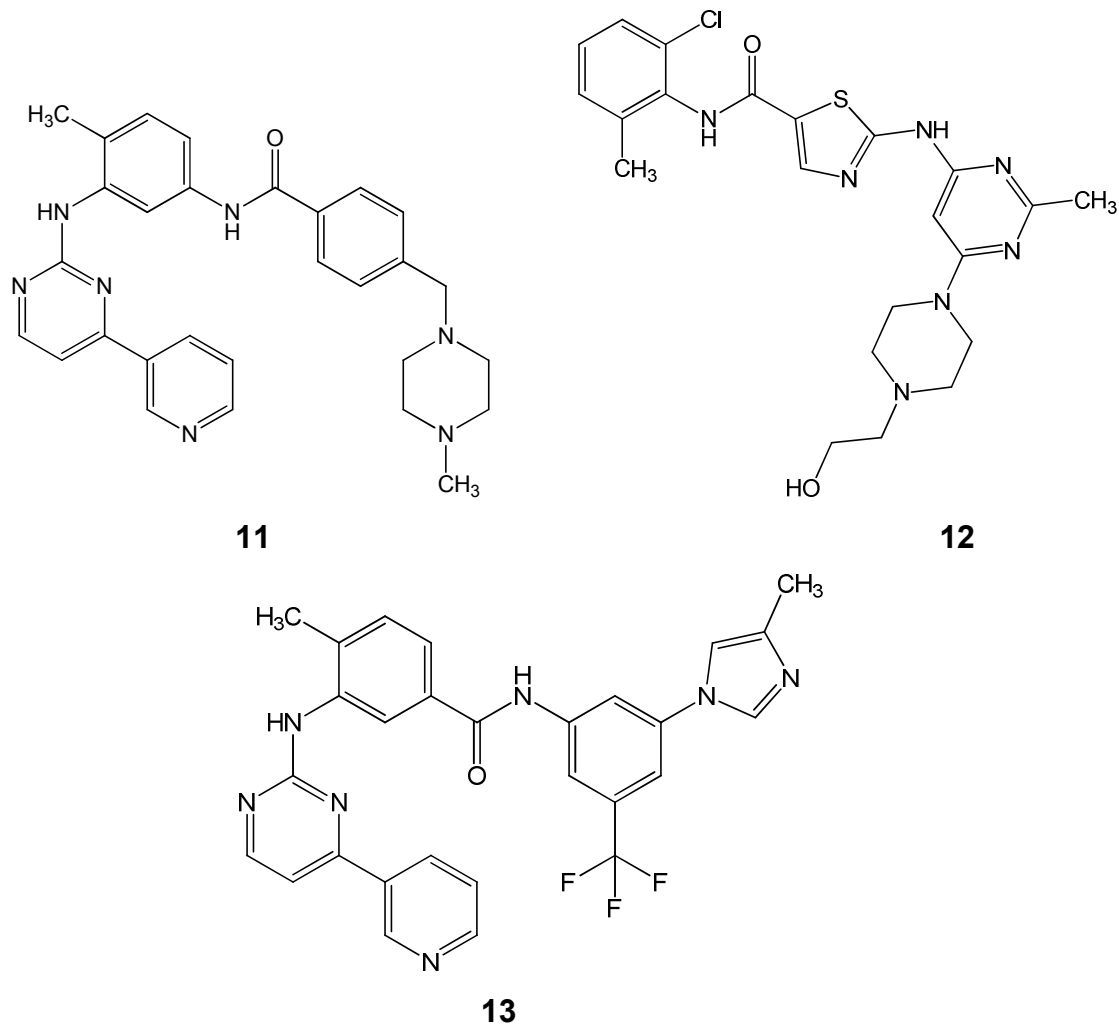


Abbildung 1-8: Imatinib (**11**), Dasatinib (**12**), Nilotinib (**13**)

Trotz der vorliegenden Ergebnisse wurde Gefitinib in einer weiteren großangelegten Studie (*Iressa[®] non-small cell lung cancer trial evaluating response and survival against Taxotere[®]*, INTEREST) untersucht, in der die Effizienz des Inhibitors im Vergleich zur Standardtherapie bewiesen werden konnte. Daraufhin wurde Gefitinib 2009 erneut in Europa für die Behandlung von lokal fortgeschrittenem und metastasierendem NSCLC zugelassen. Für den Therapieerfolg mit Gefitinib ist entscheidend, ob die angesprochene aktivierende Mutation im EGFR-Gen vorkommt, was vor der Behandlung durch eine entsprechende Typisierung festgestellt werden muss.⁶⁵

Seit der Einführung von Erlotinib (**15**) (Tarceva[®], Gentech/OSI) 2004 steht ein weiterer EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor zur Behandlung von Patienten mit metastasierendem NSCLC, die schon eine Chemotherapie erhalten haben, zur

Verfügung. Erlotinib und Gefitinib gehören beide zu den Typ-I-Inhibitoren, binden also an die aktive DFG-in-Konformation der Kinase.⁶⁶

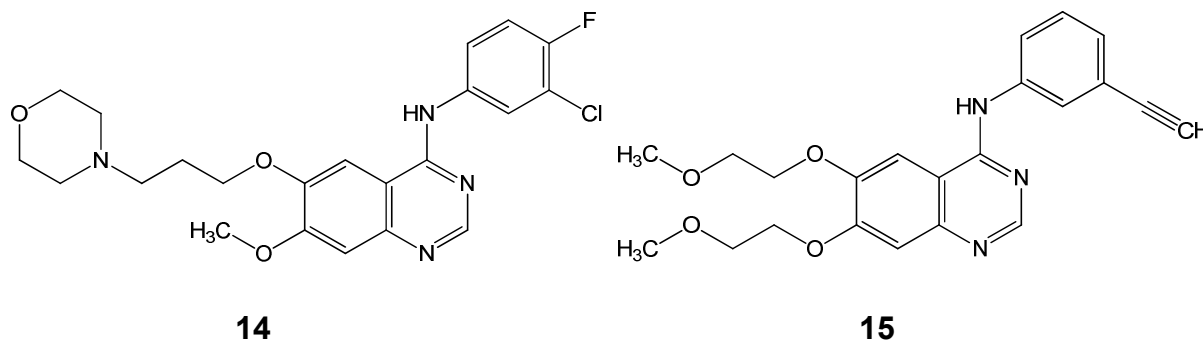


Abbildung 1-9: Gefitinib (**14**), Erlotinib (**15**)

Mit Lapatinib (**16**) (Tykerb[®], GaxoSmithKline) wurde 2008 der erste duale Inhibitor für die gezielte Inhibition der Kinasen EGFR und HER2 in den Arzneimittelmarkt eingeführt. Die Zulassung besteht für Patientinnen mit refraktär fortgeschrittenem oder metastasierendem, ErbB2-überexprimierendem Mammakarzinom in Kombination mit Capecitabin (Xeloda[®], Roche), nach Therapieversagen von Trastuzumab, Anthrazyklinen oder Taxanen.⁶⁷ Anhand der Zulassungsstudien konnte die Effizienz von Lapatinib nachgewiesen werden, da der Endpunkt, die Zeit bis zur Tumorprogression, nahezu verdoppelt wurde. Lapatinib ist auch in Kombination mit dem Aromatasehemmer Letrozole (Femara[®], Novartis) zur Behandlung postmenopausaler Patientinnen mit Hormonrezeptor- und HER2-positivem metastasiertem Brustkrebs zugelassen.⁶⁸

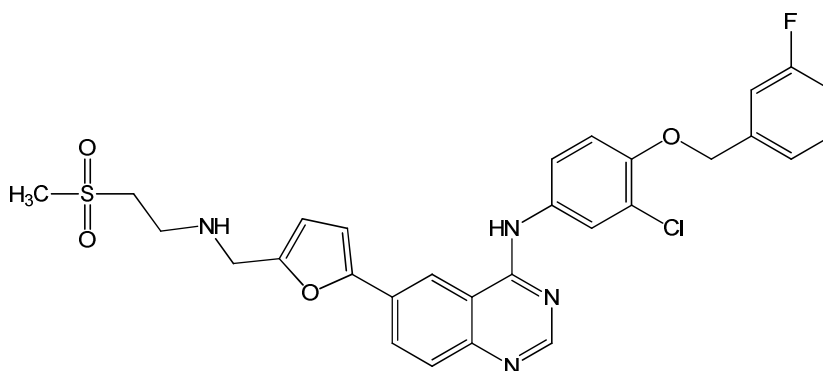
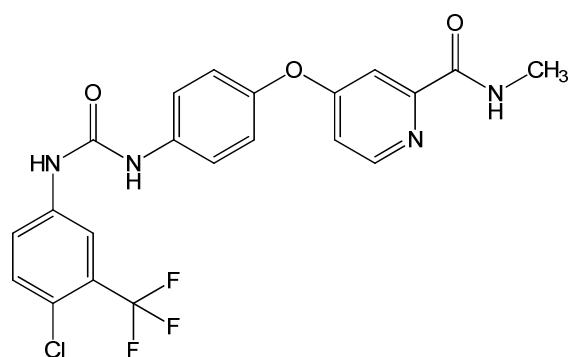


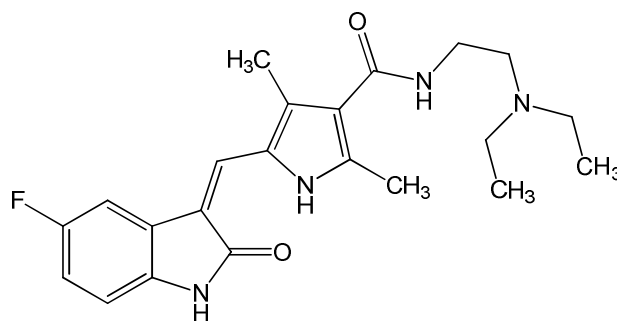
Abbildung 1-10: Dualer Inhibitor Lapatinib (**16**)

Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib (**17**) (Nexavar[®], Bayer Schering Pharma AG) wurde als RAF-Kinase-Inhibitor entwickelt. RAF-Kinase ist eine Ser/Thr-Kinase des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwegs. MAP-Kinasen sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, von denen insbesondere die RAF-Kinase Signale für die Differenzierung und Zellproliferation vermittelt. Sorafenib beeinflusst über die Inhibierung der RAF-Kinase die Weiterleitung extrazellulärer Signale über die MAPK-Signalkaskade in den Zellkern. Ferner hemmt Sorafenib unter anderem zellwachstumsfördernde Kinasen wie RET, c-KIT und Flt-3. Durch die Hemmung von VEGF-R2 und PDGFR- β stört Sorafenib die Neoangiogenese und damit die Versorgung von Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Sorafenib ist seit 2006 in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (RCC) zugelassen. 2007 wurde der Indikationsbereich auf die Behandlung von nicht resezierbaren Leberkarzinomen erweitert.^{18, 69}

Sunitinib (**18**) (Sutent[®], Pfizer) gehört ebenfalls zu den Multikinaseinhibitoren. 2006 wurde Sunitinib für die Behandlung von Patienten mit RCC zugelassen. Auf Grund vielversprechender Studienergebnisse hält Sunitinib immer stärker Einzug in den klinischen Alltag und gilt als Referenztherapie bei RCC-Patienten. Ähnlich wie Sorafenib greift es an Kinasen an, die die Proliferation des Tumorgewebes und dessen Vaskularisation fördern. Zu diesen Kinasen zählen unter anderem PDGFR- α und - β , VEGF-R1-3, c-KIT, Flt-3 und RET. Zusätzlich wurde 2006 die Zulassung für die Therapie des gastrointestinalen Stromatumors (GIST) erteilt, wenn dieser metastasiert, eine Resektion nicht möglich ist oder eine Imatinib-Therapie erfolglos war.^{18, 70, 71}



17



18

Abbildung 1-11: Multikinase-Inhibitoren Sorafenib (**17**) und Sunitinib (**18**)

Auch Pazopanib (**19**) (Votrient[®], GSK) ist seit 2010 zur Erstlinienbehandlung von Patienten mit fortgeschrittenem RCC sowie nach vorheriger Zytokin-Therapie zugelassen. Pazopanib greift an mehreren Kinasen an (VEGF-R1-3, PDGFR- α und - β , c-KIT) und vermindert dadurch das Tumorwachstum. Zwar sind keine direkten Vorteile zu etablierten Therapien belegt, aber eine Verlängerung der medianen progressionsfreien Überlebenszeit im Vergleich zu Placebo konnte in klinischen Studien gezeigt werden. Da die Zulassung durch die EMEA unter bestimmten Auflagen erteilt wurde, sind noch Vergleichsstudien anzufertigen.⁷¹

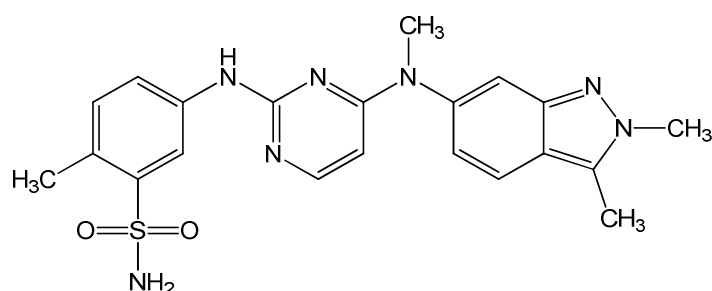


Abbildung 1-12: Pazopanib (**19**)

Im April 2011 wurde Vandetanib (**20**) von der FDA für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem medullären Schilddrüsenkrebs (MTC) zugelassen. Schon jetzt besitzt Vandetanib *Orphan Drug*-Status in Kanada und Europa zur Behandlung des MTCs und in den USA zur Therapie von äußerst seltenen Formen von Schilddrüsenerkrankungen. Bedingt durch mögliche Schäden am Herzen wie QT-Zeitverlängerung, Torsade de pointes und plötzlichem Herztod wurde eine Strategie zur Risikobewertung und -minimierung (*Risk Evaluation and Mitigation Strategy*) bei der Therapie mit Vandetanib notwendig. Da der therapeutische Nutzen in der Behandlung von MTC gegenüber den Risiken im Einzelfall überwiegt, ist ein eingeschränkter Einsatz durch zertifizierte Ärzte möglich. Vandetanib (**20**) (Zactima[®], AstraZeneca) hemmt die Kinasen VEGF-R2, EGFR sowie die für das Wachstum wichtige RET.⁷²

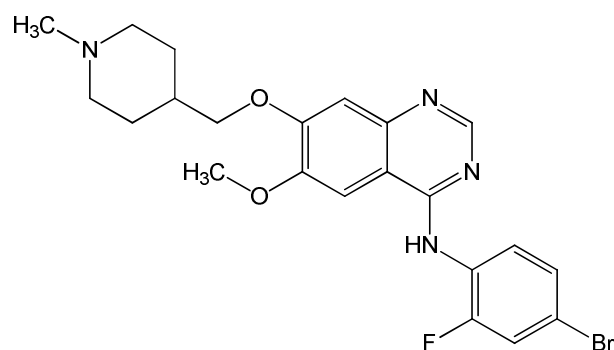


Abbildung 1-13: Vandetanib (**20**)

1.5.2 Inhibition der extrazellulären Rezeptor-Liganden-Interaktion

Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Ligandenbindestelle der Rezeptortyrosinkinasen führte zu sehr spezifischen Inhibitoren, die die Signalweiterleitung blockieren. Insbesondere EGFR (ErbB1, HER1) und ErbB2 (HER2) können auf diese Weise in ihrer Funktion gestört werden. HER1 und 2 gehören zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Sie sind Rezeptortyrosinkinasen und werden durch Liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert. EGFR und HER2 sind in verschiedenen Tumorarten überexprimiert und fördern wesentliche Prozesse der Tumorphysion wie Zellüberleben, Angiogenese, Invasion und Metastasierung.⁷³

Cetuximab (Erbix[®], Merck) ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper, der zur Behandlung von metastasierendem Kolorektalkarzinom (Kombination mit Irinotecan oder als Monotherapie) sowie von Kopf- und Halstumoren (Monotherapie oder in Kombination mit Strahlentherapie) zugelassen ist. Erbitux[®] bindet selektiv an den EGF-Rezeptor (ErbB1) und bedingt dessen Internalisierung. Dadurch wird die Signalweiterleitung gehemmt und der Rezeptor verliert seine Funktion, was eine *Down-Regulation* zur Folge hat. Ferner kann eine Antikörper-vermittelte Lyse entarteter Zellen ausgelöst werden.

Zur Reduktion der hervorgerufenen Immunogenität, die durch das im Antikörper enthaltene Mausprotein induziert wird, wurden immer wieder neue Antikörper mit verringertem murinen Anteil hergestellt. Neben chimären Antikörpern sind auch humanisierte oder humane Antikörper in der Therapie maligner Erkrankungen zugelassen. Bei humanisierten Antikörpern ist der Mausanteil auf die hypervariablen

Regionen (Komplementarität-bestimmende Region) beschränkt und der humane Antikörper wird mittels Phagen-Display-Technologie hergestellt.⁷⁴

Trastuzumab (Herceptin[®], Roche) ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, der hochaffin an HER-2 (*human epidermal growth factor-2*) bindet. Seit 2000 ist Herceptin[®] zur Therapie von HER-2-exprimierendem metastasierendem Brustkrebs (ca. 1/3 der Patienten) zugelassen. Das Mammakarzinom kann entweder in Monotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel/Docetaxel behandelt werden. Eine Kardiotoxizität wird unter der Therapie beobachtet.

Ein rein humaner Antikörper ist der seit 2007 zugelassene IgG2 Antikörper Panitumumab (Vectivix[®], Amgen). Panitumumab bindet ähnlich wie Cetuximab an den EGFR und ist auch zur Behandlung von metastisierendem Kolorektalkarzinom zugelassen. Von der Therapie profitieren ausschließlich Patienten, die kein mutiertes K-Ras-Gen aufweisen. Das mutierte K-Ras-Gen verursacht die Bildung von konstitutiv aktiviertem K-Ras-Protein. Dadurch wird die MAPK-Signalkaskade dauerhaft aktiviert, selbst wenn der EGFR durch Antikörper blockiert wird.^{75, 76}

1.5.3 Inhibition durch Abfangen der Liganden

Rezeptor-Tyrosinkinasen werden durch Liganden aktiviert. Statt die Liganden-Rezeptor-Interaktion zu verhindern, kann die Signalweiterleitung auch durch Abfangen der Liganden mit Antikörpern verhindert werden.

Bevacizumab (Avastin[®], Hoffmann LaRoche) ist ein humanisierter, monoklonaler IgG1-Antikörper, der seit 2005 in Europa zur Erstlinienbehandlung von metastasierendem Kolorektalkarzinom in Kombination mit 5-Fluorouracil/Folinsäure oder 5-Fluorouracil/Irinotecan eingeführt wurde. Als erster Angiogenese-Hemmer bindet Bevacizumab gezielt den Wachstumsfaktor VEGF und damit dessen Wechselwirkung mit dem VEGF-R2. Die Angiogenese wird unterbrochen und das Tumorwachstum und die Metastasierung gehemmt. Die Zulassung wurde auf die Indikationsbereiche Brustkrebs, NSCLC, Nierenzellkarzinom und Glioblastom ausgeweitet.¹⁸

Das rekombinante Fusionsprotein VEGF-Trap (Aflibercept[®], Regeneron/Sanofi Aventis) ist eine weitere neuartige Möglichkeit, VEGF selektiv zu inhibieren. Dieser

Angiogenesehemmer ist eine Kombination von Fragmenten der extrazellulären Domäne der VEGF-R1 und -R2 mit dem Fc-Teil des humanen IgG-Antikörpers. Seine Bindungsaffinität zu VEGF ist stärker als die eines physiologischen Antikörpers. VEGF-Trap befindet sich zurzeit in klinischen Prüfungen gegen diverse Krebsarten.⁷⁵

1.5.4 Inhibition der Genexpression

Die Gentherapie ist ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung resistenter Karzinome. Die Basis bildet der molekular-biologische Unterschied normaler Zellen zu Tumorzellen.

Eine Möglichkeit in der Gentherapie ist die *Antisense*-Strategie. Diese Technik nutzt synthetisch hergestellte Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zur mRNA eines spezifischen Zielgens ist. Durch sequenzspezifische Hybridisierung des *Antisense*-Oligonukleotides mit einer für Kinasen codierenden mRNA kann die Proteinbildung verhindert werden. Dies erfolgt entweder durch Störung der Translation in den Ribosomen oder durch den Abbau der Oligonukleotid-DNA/mRNA-Hybride durch die Nuklease RNase H. Die Oligonukleotide greifen in den Mechanismus pathologischer Prozesse ein und unterdrücken die Expression von Onkoproteinen (Bcl-2, c-Raf, c-Myc, c-Myb und XIAP) oder fokussieren direkt Signalmoleküle (VEGF-R, IGF-1R, TGF- β II und PKA), die an der Tumorgenese beteiligt sind. Zwei zugelassene Oligonukleotide sind das Genasense[®] (Oblimersen) gegen Bcl-2 und das Vitravene[®] (Fomivirsen) gegen die HIV-assoziierte Zytomegalovirusbedingte Retinitis.^{77, 78}

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die ähnlich wie *Antisense*-Oligonukleotide in der Lage sind, gezielt mRNA zu spalten und dadurch die Genexpression zu unterdrücken. Sie wurden erfolgreich gegen das pathogene BCR-ABL-Protein der chronisch-myeloischen Leukämie eingesetzt.⁷⁸

Eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Genexpression ist die RNA-Interferenz, welche die posttranskriptionelle Regulation der genetischen Aktivität durch doppelsträngige RNA (dsRNA) bezeichnet. Dabei werden kurze RNA-Fragmente, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNA), in einen Nuklease-Komplex (*RNA-induced silencing complex*, RISC) eingebaut. Es kommt zur Auftrennung in

Einzelstrang-RNA und in der Folge zur teilweisen oder vollständigen Unterdrückung der Genexpression.⁷⁸

1.6 Indirubin als Leitstruktur für Tumorthapeutika

Als Indigoide werden chemisch Vertreter aus der Familie der Bis-Indole wie z.B. Indigo und Indirubin bezeichnet. Die Familie der Indigoide besitzt eine bemerkenswerte pharmazeutische, historische und kulturelle Bedeutung. Indirubin, das rotgefärbte Isomer des Indigo, bildet sich spontan durch eine nicht-enzymatische Kondensation von Isatin und Indoxyl, die beide in verschiedenen Naturprodukten gefunden wurden.^{79, 80} Bei einem gestörten Tryptophanabbau (Indicanurie) konnte bei nierenkranken Patienten eine Violettfärbung des Urins beobachtet werden, die auf die Bildung von Indirubin zurückzuführen ist (*purple urine bag syndrome*, PUBS).⁸¹

Danggui Longhui Wan ist eine Zubereitung aus der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM). Es besteht aus 11 Kräutern, die für die Behandlung von verschiedenen chronischen Erkrankungen, darunter auch der chronisch-myeloischen Leukämie (CML), verwendet wird. Untersuchungen zur Aufklärung der aktiven Komponente führten zum Qing Dai, auch *Indigo naturalis* genannt.⁸² Dieses Pulver enthält Indirubin (**21**), das als eigentlicher aktiver Wirkstoff gilt. Dem Indirubin werden, als mengenmäßig kleinem Bestandteil der Kräutermischung, die anti-leukämischen Eigenschaften zugeschrieben.^{79, 80}

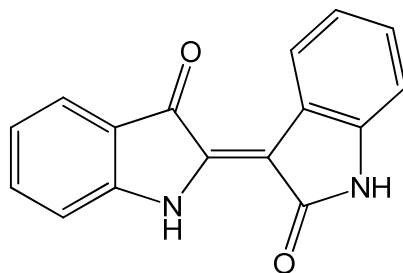


Abbildung 1-14: Indirubin (**21**)

Verschiedene Forschergruppen haben intensiv den Wirkmechanismus von Indirubin und einigen seiner Derivate untersucht.^{79, 83, 84} Hoessel et al.⁸³ beschreiben, dass Indirubin und seine Derivate selektiv Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) in der späten

G1- und G2/M-Phase des Zellzyklus inhibieren und dadurch die Zellproliferation hemmen. Derivate des Indirubins wie Indirubin-3'-monoxim (IC_{50} 0.18 μ M, **10**), 5-Chlorindirubin (IC_{50} 0.4 μ M, **22**) und Indirubin-5-sulfonsäure (IC_{50} 0.055 μ M, **23**) inhibieren CDK1/Cyclin B im submikromolaren Bereich und besitzen eine vergleichbare inhibitorische Aktivität zu literaturbekannten CDK-Inhibitoren wie Roscovitin (IC_{50} 0.45 μ M, **5**), Staurosporin (IC_{50} 0.0006 μ M, **24**) und Flavopiridol (IC_{50} 0.4 μ M, **4**). Sie sind ATP-kompetitive Inhibitoren.⁸³

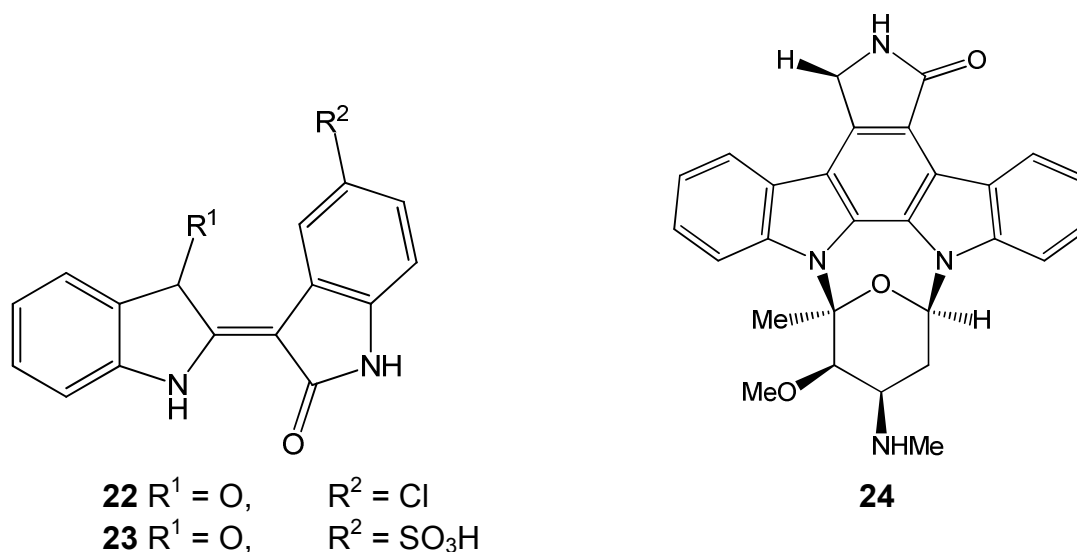
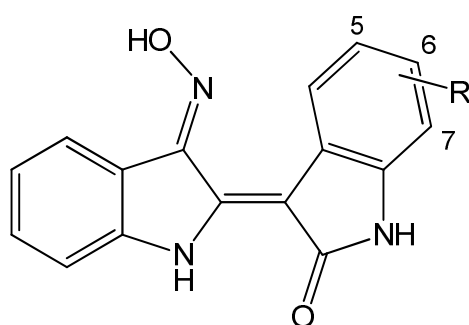


Abbildung 1-15: CDK-Inhibitoren: Vertreter aus der Klasse der Indirubine (**22** und **23**) und Staurosporin (**24**)

Nach Meijer et al.⁷⁹ inhibieren die Bis-Indole neben CDKs auch GSK-3, JNK, SRC und den Stat3 Transkriptionsfaktor mit moderater Aktivität. Auch AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) stellt eine Zielstruktur von Indirubin und Indigo dar.^{79, 85}

Es wurden mit Indirubin Studien am Menschen und am Tier durchgeführt. Dabei wurde in peripheren Blutproben eine Veränderung der Oberfläche von weißen Blutkörperchen gefunden.⁸² Eine Knochenmark- und Hämatotoxizität hingegen blieb in Langzeitstudien aus. Bei einer 6 Monate dauernden Studie mit Hunden, bei der eine 25 mal höhere Dosis als in entsprechenden Humanstudien verabreicht wurde, konnten als toxische Wirkungen lediglich eine reversible Diarrhö und eine geringe Hepatotoxizität festgestellt werden.⁸³

Indirubin ist auf Grund seiner schlechten Löslichkeit nicht in klinischem Gebrauch. Zur Verbesserung der Selektivität, Löslichkeit und Effektivität gegen Tumorstadium wurde eine große Anzahl neuer Derivate synthetisiert.^{83, 84} Veränderungen an der 5-, 6- und 7-Position des Indirubins führten zu neuen Derivaten mit signifikanten Unterschieden in der biologischen Aktivität. In verschiedenen biologischen Untersuchungen konnte beispielsweise eine proliferationsanregende Wirkung in Kardiomyozyten festgestellt werden.⁸⁶ 5-Bromindirubin-3'-oxim (5BIO, **25**) und 6-Bromindirubin-3'-oxim (6BIO, **26**) werden als CDK- und GSK-3 β -Inhibitoren beschrieben.^{87, 88} Das 7-Brom-Analogon (7BIO, **27**) hingegen besitzt einen geänderten Wirkmechanismus. Ribas et al.^{89, 90} beschreiben, dass 7BIO durch Nekrose oder Autophagozytose den Zelltod herbeiführt.



25 R = 5-Br
26 R = 6-Br
27 R = 7-Br

Abbildung 1-16: Struktur von 5-, 6-, 7-Bromindirubin-3'-oxim (**25-27**)

Die Indigoide zeigen auch gegenüber bestimmten Kinasen parasitärer Erreger tropischer Infektionskrankheiten eine moderate inhibitorische Aktivität.⁹¹

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Synthesemethoden für drei Klassen potentieller Proteinkinase-Inhibitoren entwickelt und etabliert werden. Bei diesen Verbindungstypen handelt es sich um (2.1) Anilinopyrimidine, (2.2) Tetrabromisoindole und (2.3) Mini-Indirubine. Aus den Ergebnissen der biologischen Testung sollten anschließend Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die einzelnen Strukturklassen abgeleitet werden.

2.1 Anilinopyrimidine

Die von Kohfeld⁹² synthetisierten 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**28**) zeigen deutliche inhibitorische Aktivität an tumorrelevanten Kinasen. Vor allem die Kinasen VEGF-R2 und -R3, Aurora A und B, FAK und SRC werden im submikro- bis nanomolaren Bereich gehemmt.

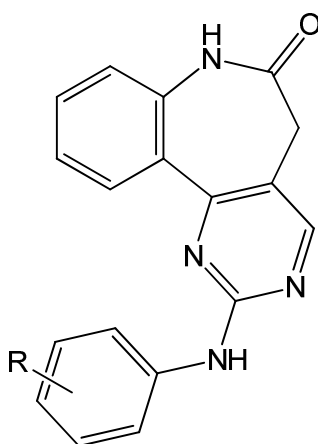


Abbildung 2-1: 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**28**)

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten durch strukturelle Modifizierungen neuartige, bisher nicht durch Patente abgedeckte Proteinkinase-Inhibitoren erschlossen werden. Anhand durchgeführter Docking-Studien von Egert-Schmidt et al.⁹³ konnte gezeigt werden, dass für die Bindung an die *hinge region* der 2-Anilino-pyrimidin-Teil notwendig ist, da dieser den Adenin-Grundkörper des ATP imitiert, der selbst über drei Wasserstoffbrücken an die *hinge region* bindet.

Zahlreiche Kinaseinhibitoren weisen als Strukturelement das 2-Anilinopyrimidin-Motiv auf. Dazu gehört der im Rahmen der Einleitung genannte nanomolare PLK1-Inhibitor BI 2536 (**1**), der sich zurzeit in der klinischen Prüfung befindet. Ein PLK1-Inhibitor aus der Gruppe der Dihydropteridinone ist BI 6727 (Boehringer Ingelheim, **29**) mit einem IC_{50} -Wert für PLK1 von 0.87 nM.⁹⁴ PLK2 und PLK3 werden jeweils mit IC_{50} -Werten von 5 nM und 56 nM gehemmt.²⁰ Auch neuere Untersuchungen zur Entwicklung potenter PLK-Inhibitoren machen sich die Anilinopyrimidin-Teilstruktur zu nutze. Beispielhaft sei das von Caruso et al.⁹⁵ synthetisierte 5-(2-Aminopyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrrol-Derivat (**30**) mit einem IC_{50} -Wert für PLK1 von 0.015 μ M genannt.

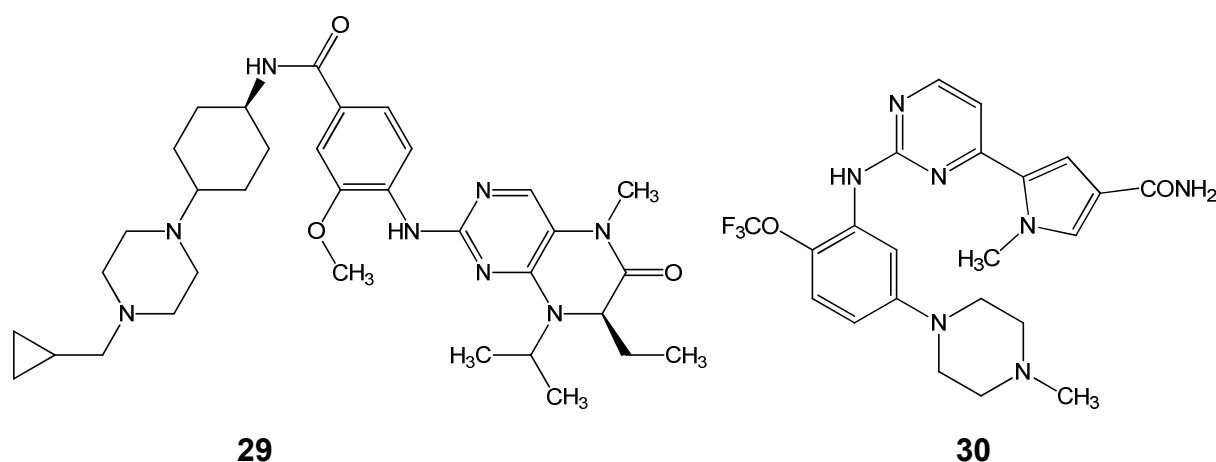


Abbildung 2-2: PLK1-Inhibitoren mit Anilinopyrimidin-Teilstruktur: BI 6727 (**29**) und das 5-(2-Aminopyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrrol-Derivat (**30**)

In Position 4 durch Benzimidazol-2-yl-Reste substituierte 2-Anilinopyrimidine waren bisher nicht literaturbekannt. Ausgehend von dem einfach herzustellenden Enaminon **39a** wurde daher die Synthese von Vertretern der Verbindungsklasse **31** angestrebt, die anschließend Kooperationspartnern für Testzwecke zur Verfügung gestellt werden sollten.

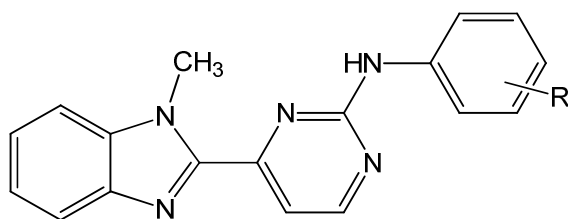


Abbildung 2-3: Darzustellende Anilinopyrimidine **31**

2.2 Tetrabromisoindole

Das Tetrabrombenzotriazol (TBB, **3**) und 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabrom-1*H*-benzimidazol (DMAT, **32**)³² sind etablierte Standardhemmstoffe der Proteinkinase CK2.

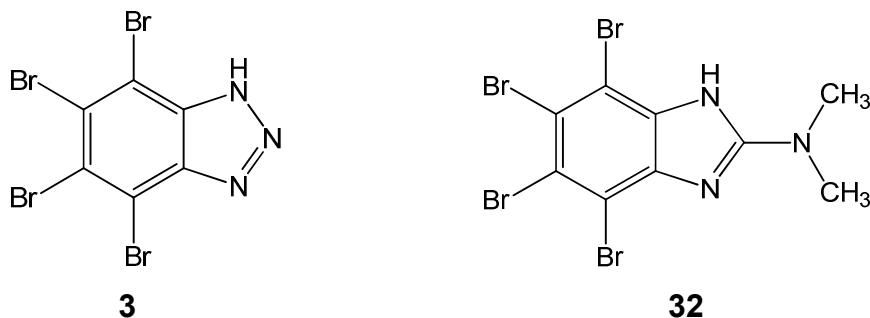
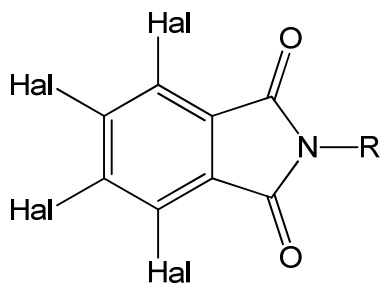


Abbildung 2-4: CK2-Inhibitoren TBB (**3**) und DMAT(**32**)

Golub et al.⁹⁶ beschreiben neue potente CK2-Inhibitoren mit 4,5,6,7-Tetrahalogen-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dion-Grundstruktur (TID, **33**). Bei dem an den Stickstoff gebundenen Rest R handelt es sich jeweils um substituierte aliphatische Säuregruppen. Vertreter dieser Klasse hemmen, ähnlich dem TBB und DMAT, die Kinase im unteren mikromolaren Bereich.



33 Hal = Br, Cl, I; R = substituierte aliphatische Säuregruppen

Abbildung 2-5: Allgemeine Struktur der TID-Inhibitoren nach Golub et al.⁹⁶

Beispiele dieser Verbindungsklasse mit guter inhibitorischer Aktivität sind unter anderem TID 43 **34** ($IC_{50} = 0.3 \mu M$) und TID 46 **35** ($IC_{50} = 0.15 \mu M$).

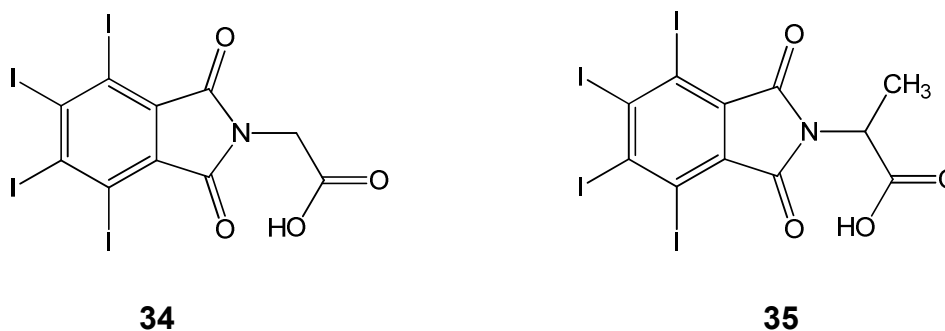


Abbildung 2-6: Strukturformeln der Verbindungen TID 43 **34** und TID 46 **35**

In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte der tetrahalogenierte Aromat aus **3**, **32** und **33** sowie das Phthalimid-Motiv aus **33** bei der Suche nach neuen potentiellen CK2-Inhibitoren erhalten bleiben. Unter der Annahme, dass der Aromat über Halogenbrücken in der ATP-Bindetasche gebunden wird, sollte durch die Einführung von zyklischen Substituenten am Stickstoff die Ausbildung zusätzlicher Wechselwirkungen in der ATP-Bindetasche ermöglicht werden.

2.3 Mini-Indirubine

Der Naturstoff Indirubin (**21**) ist ein potenter Inhibitor vor allem von CDK1, CDK2, CDK5,⁷⁹ der GSK-3 β und der Aurora-Kinasen.⁸³ Ähnlich Indirubin zeigen seine Derivate wie Indirubin-3'-monoxim (**10**) und Indirubin-5-sulfonsäure (**23**) eine Präferenz gegenüber Mitgliedern der CDKs.^{34, 79, 83} Das 6-Bromoindirubin-3'-oxim (6BIO, **26**) besitzt eine erhöhte Selektivität gegenüber GSK-3 β .^{84, 88, 97} Im Rahmen dieser Arbeit sollte Indirubin (**21**) als Leitstruktur verwendet werden, um neue Proteinkinase-Inhibitoren zu erschließen.

Nach Choi et al.³⁴ sind für die Orientierung in der ATP-Bindetasche die rotgefärbten Bereiche aus **21** notwendig. Das gekennzeichnete Strukturmotiv ähnelt dem Donor-Akzeptor-Donor-Prinzip des ATP in der Bindetasche. Die Strukturtypen **36** und **37**, die als Mini-Indirubine bezeichnet werden, sind formal aus Indirubin (**21**) abgeleitet. Dabei wurden einerseits die Benzoanellanden der in **21** enthaltenen Indolsysteme entfernt und andererseits die verbliebenen Pyrrol-Ringe durch eine weitere C₂-Kette verknüpft. Das so entstandene, als Grundstruktur in **36** und **37** enthaltene System aus 3 Ringen ist systematisch als Pyrrolo[3,4-g]indol zu bezeichnen. Bei der Synthese solcher Verbindungen sollte zur Etablierung von Struktur-Aktivitäts-

beziehungen der Indolring an Position 2 und 3 mit unterschiedlichen Alkyl- und Arylgruppen substituiert werden.

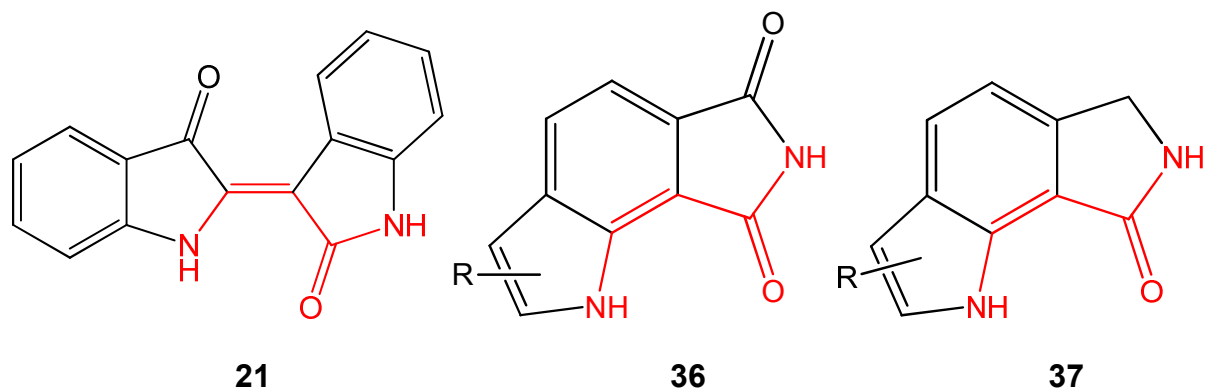


Abbildung 2-7: Indirubin (**21**) und darzustellende Mini-Indirubine **36** und **37**

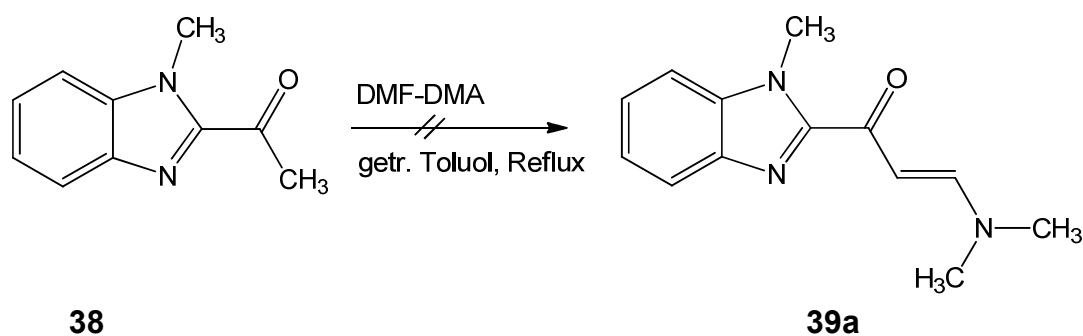
3 Synthese

3.1 Darstellung der 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine **31**

Die Synthese der Anilinopyrimidine **31** erfolgt durch Umsetzung des 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**) mit Arylguanidinium-nitrat **43**.

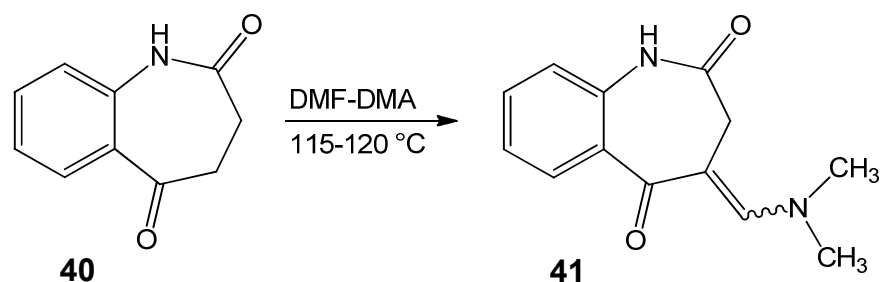
3.1.1 Synthese des Enaminoketons **39a**

Das Enaminoketon **39a** wurde aus dem entsprechenden 2-Acetylbenzimidazol **38** synthetisiert. Dazu setzt die Arbeitsgruppe von Shaaban et al.⁹⁸ **38** und Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMF-DMA) in getrocknetem Toluol für 8 h unter Reflux um (Schema 3-1).



Schema 3-1: Darstellung von 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-prop-2-en-1-on (**39a**) nach Shaaban et al.⁹⁸

Nach dieser Synthesevorschrift ließ sich kein Produkt isolieren. Kohfeld⁹² setzt nach einer Vorschrift von Chen und Gilman⁹⁹ 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**40**) mit DMF-DMA bei 115-120 °C zum Enaminoketon **41** um (Schema 3-2).



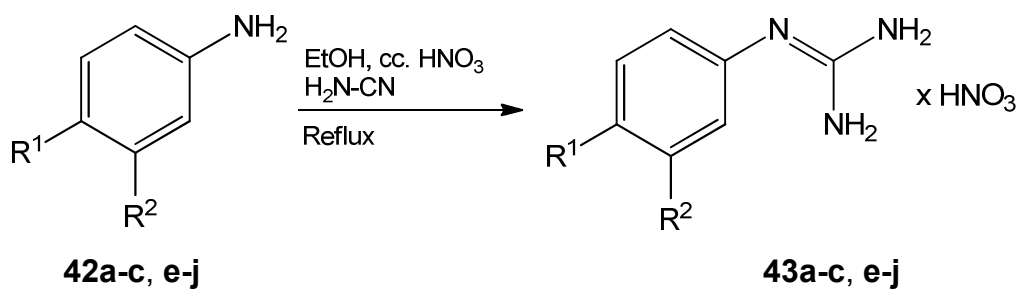
Schema 3-2: Synthese von 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**41**)

Analog dazu konnte auch das Acetylbenzimidazol **38** in DMF-DMA bei 115-120 °C zum Enaminoketon **39a** umgesetzt werden. Das überschüssige Reagenz DMF-DMA wurde anschließend eingengt und das erhaltene Produkt aus Toluol/Petrolether im Verhältnis 1:1 umkristallisiert.

Die analytischen Daten von Shabaan et al.⁹⁸ für das 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**) stimmen mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten überein. Allerdings beschreiben Shaaban et al. im ¹H-NMR in DMSO-*d*₆ für die Protonen der *N,N*-Dimethylgruppe ein Singulett mit der Intensität von 6 Protonen und für die Protonen des aromatischen Systems ein Multiplett mit der Intensität von 4 Protonen. Das im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Spektrum weist für die Methylprotonen zwei Singuletts bei δ = 2.94 und 3.19 ppm mit der Intensität von jeweils 3 Protonen auf. Für die aromatischen Protonen werden vier separate Signale mit einer Intensität von jeweils einem Proton erhalten. Die Aufspaltung in zwei Singuletts der Dimethylaminogruppe resultiert aus einer eingeschränkten Drehbarkeit um die C(sp²)-N-Bindung des Enaminomotivs.

3.1.2 Synthese der Phenylguanidiniumnitrate **43**

Die Synthese der Arylguanidiniumnitrate **43a-c** und **43e-j** erfolgte nach einer von Kohfeld⁹² und Berger¹⁰⁰ modifizierten Vorschrift von Tavares et al.¹⁰¹. Die Anilinderivate **42a-c** und **42e-j** wurden in Ethanol gerührt und mit konzentrierter Salpetersäure (65%) versetzt. Anschließend wurde eine 50%ige Cyanamidlösung tropfenweise zugegeben und für ca. 18 h zum Rückfluss erhitzt (Schema 3-3). Zum Ausfällen des Produktes musste der Ansatz gekühlt werden. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Propan-2-ol.



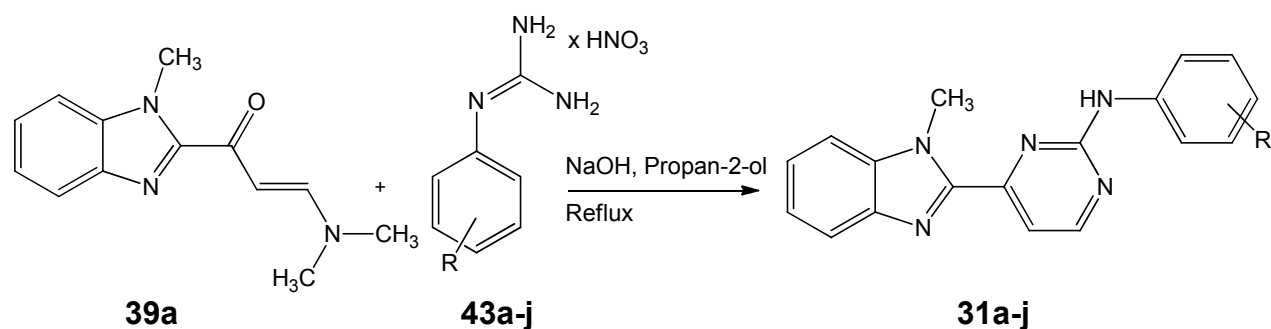
	R ¹	R ²
a	H	H
b	-CH ₃	H
c	-Cl	H
d	Morpholin-4-yl	H
e	-OC ₂ H ₅	H
f	-OCH ₃	H
g	-OH	H
h	H	-OH
i	-OH	Cl
j	-OCH ₃	-OH

Schema 3-3: Darstellung der Phenylguanidiniumnitrats **43**

Das 2-(4-Morpholinophenyl)guanidin (**43d**) war kommerziell erhältlich.

3.1.3 Synthese der 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine **31**

Die Darstellung der Anilinopyrimidine **31a-j** erfolgt nach einer von Moffat et al.¹⁰² beschriebenen und von Kohfeld⁹² modifizierten Methode. Dazu wurde ein Äquivalent des Enaminoketons **39a** mit 1.2 Äquivalenten des jeweiligen Arylguanidiniumnitrats **43a-g** und 1.2 Äquivalenten Natriumhydroxid in Propan-2-ol zum Rückfluss erhitzt. Das gewünschte Produkt fällt nach Abkühlung aus dem Reaktionsgemisch aus. Anschließend wurde aus Ethanol umkristallisiert (Schema 3-4).



Schema 3-4: Darstellung der Anilinopyrimidine **31**

Substituenten R: siehe Schema 3-3

Nachteilig bei der Synthese der Anilinopyrimidine **31a-j** waren die sehr langen Reaktionszeiten. Durch mikrowellengestützte Synthese konnte bei **31j** die 30stündige Reaktionszeit auf 1.5 h verkürzt und die Ausbeute erhöht werden. Die Mikrowellen-Methode wurde unter Beibehaltung der Grundbedingungen in Anlehnung an die Vorschrift von Kohfeld⁹² verwendet. Dabei wurde bei 150 °C und einer Mikrowellenleistung von 150 Watt die Synthese durchgeführt.

Bei der Aufarbeitung der Produkte **31a-j** erwies es sich als vorteilhaft, den aus dem Ansatz erhaltenen Niederschlag mit reichlich Wasser zu waschen, um die als Nebenprodukte ausgefallenen anorganischen Salze zu beseitigen. Falls die Reinheit einiger Endprodukte auch nach Umkristallisation nicht zufriedenstellend war, wurden diese einem zusätzlichen chromatographischen Reinigungsschritt unterzogen.

Der Ersatz des siedenden Isopropanols als Reaktionsmedium durch siedendes Dimethylformamid führte durch die höheren Temperaturen zu mehr Nebenprodukten. Auch die Erhöhung der Natriumhydroxid-Menge wirkte sich unvorteilhaft aus.

Bei der Synthese der Anilinopyrimidine **31a-j** wurden Arylguanidiniumnitrate mit einem Substitutionsmuster am Aromaten verwendet, das sich auch bei den von Kohfeld⁹² hergestellten Kinaseinhibitoren **28** als günstig für eine starke kinaseinhibitorische Aktivität herausgestellt hatte.

Substituierte 6-Aminopyrimidine wie das 6-Amino-1,3-dimethyluracil (**44a**) besitzen in Position 5 ein nukleophiles Potential, wodurch dort der Angriff elektrophiler Reagenzien (z.B. Enaminone) erleichtert wird. Die Erhöhung der Elektronendichte in Position 5 ist auf die Enaminteilstruktur zurückzuführen. Es können mesomere Grenzformeln formuliert werden, in denen dem Stickstoff der 6-Aminogruppe eine positive und dem Kohlenstoff in Position 5 eine negative Ladung zukommt (Abb.: 3-2).

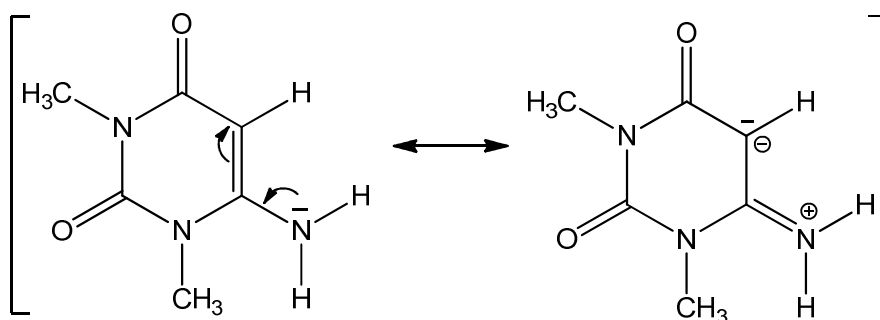
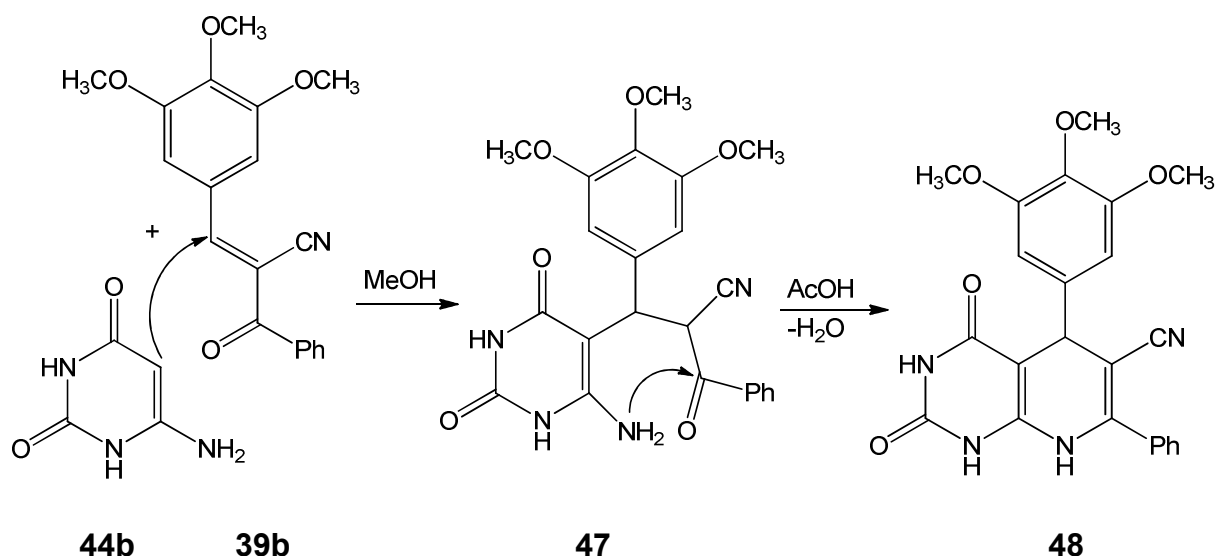


Abbildung 3-2: Mesomere Grenzformeln des 6-Amino-1,3-dimethyluracils (**44a**)

Auch in der Literatur wird überwiegend der C5-Position von substituierten 6-Aminopyrimidinen eine erhöhte Nukleophilie zugeschrieben. Wie in Schema 3-5 abgebildet, erfolgt der initiale Angriff vom Kohlenstoff in Position 5 der Verbindung **44** auf den β -Kohlenstoff des Enons **39**. Der sich anschließende Ringschluss resultiert aus dem Angriff der 6-Aminogruppe an das zweite elektrophile Zentrum des 1,3-Bis-elektrophils. Dieser Reaktionsmechanismus, auch Michael-Additions-Zyklodehydratation genannt, wird in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben.¹⁰³⁻¹⁰⁸

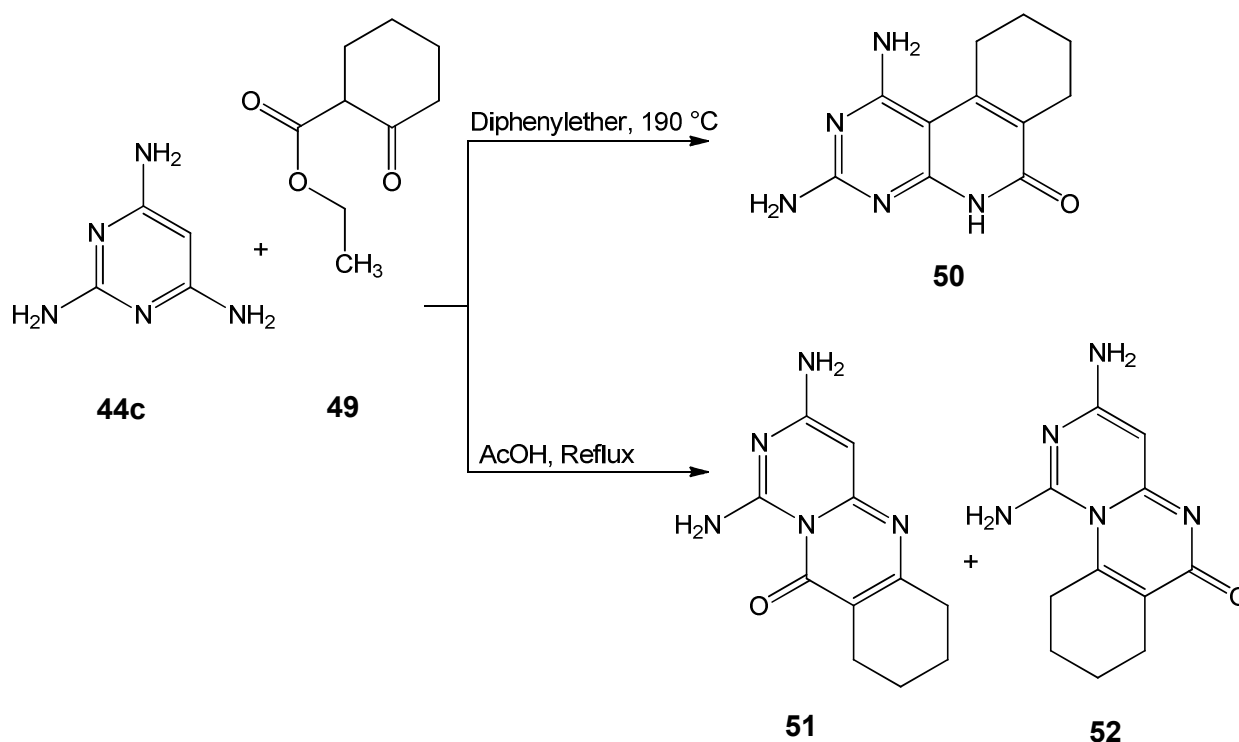
Bagley et al.¹⁰⁹ konnten durch Isolierung des Michael-Adduktes **45** die Regioselektivität belegen. Auch Troschütz et al.¹¹⁰ erhielten bei der Umsetzung von 6-Aminouracil (**44b**) mit dem Prop-2-enon **39b** in siedendem Methanol das Michael-Addukt **47**. Der Ringschluss zum Produkt **48** wurde von der Arbeitsgruppe durch Erhitzen in Essigsäure erzielt (Schema 3-6).



Schema 3-6: Darstellung des Reaktionsmechanismus nach Troschütz¹¹⁰

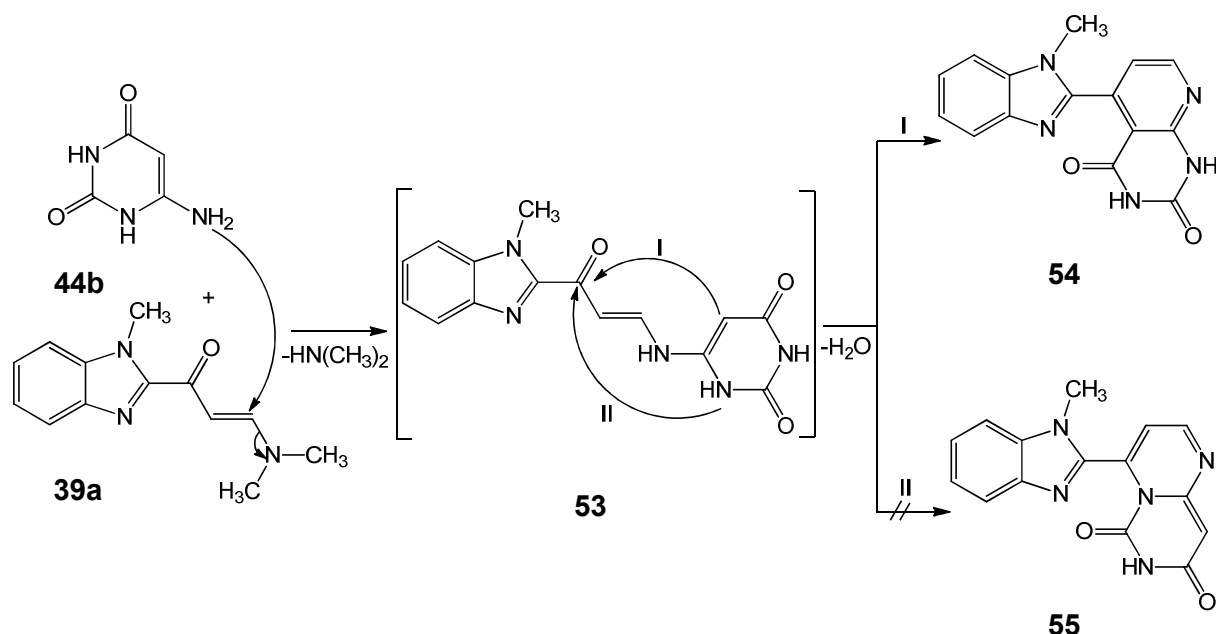
Jedoch konnten sowohl Troschütz et al.¹¹⁰ als auch Vasudevan et al.¹¹¹ eine Abhängigkeit zwischen der Reaktivität von 6-Aminopyrimidinen und der Wahl der Reaktionsbedingungen beobachten.

Vasudevan et al.¹¹¹ beschreiben ausführlich die Korrelation zwischen den reaktiven Zentren der 6-Aminopyrimidine und den 1,3-Biselektrophilen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Bei der Umsetzung von 2,4,6-Triaminopyrimidin (**44c**) mit **49** wurden von der Arbeitsgruppe abhängig vom verwendeten Lösungsmittel und von der Temperatur drei mögliche Strukturisomere diskutiert (Schema 3-7). Dabei erfolgt in siedendem Diphenylether der initiale Angriff vom nukleophilen C5-Pyrimidin-Kohlenstoff. Der sich anschließende Ringschluss erfolgt durch Angriff der exozyklischen Aminogruppe am Ester-Carbonylkohlenstoff, wodurch Produkt **50** resultiert. In refluxierender Essigsäure reagierten dagegen der N1-Stickstoff und die 6-Aminogruppe des Aminopyrimidins **44c** mit den elektrophilen Zentren von **49** zu einem 1:1-Gemisch der Isomere **51** und **52**.



Schema 3-7: Umsetzung von 2,4,6-Triaminopyrimidin (**44c**) mit 2-Cyclohexanon-carbonsäureethylester (**49**) nach Vasudevan¹¹¹

Anhand einer literaturbekannten Umsetzung nach Shaaban et al.¹¹² sollte im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch geprüft werden, welchem Mechanismus diese Reaktion folgt. Die Arbeitsgruppe setzt zur Darstellung des Pyrido[2,3-*d*]pyrimidins **54** das Enaminon **39a** in Eisessig mit 6-Aminouracil (**44b**) zum Rückfluss um. Entgegen dem voranstehend beschriebenen Reaktionsmechanismus (Schema 3-5) soll hier der initiale Angriff nicht über den C5-Enamin-Kohlenstoff des 6-Aminopyrimidins erfolgen. Stattdessen postuliert die Arbeitsgruppe folgenden Mechanismus (Schema 3-8):



Schema 3-8: Reaktionsmechanismus nach Shabaan et al.¹¹²

Initial wird die exozyklische Aminogruppe des Aminouracils **44b** nach Art einer Michael-Reaktion an die Doppelbindung des Enaminons **39a** angelagert, gefolgt von der Eliminierung der Dimethylaminogruppe. Es kommt zur Bildung eines nicht isolierbaren Zwischenprodukts **53**. Der Ringschluss erfolgt über einen zweiten nucleophilen Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff des Enaminons. Bei einem Angriff vom Kohlenstoff-Atom C5 an die Enaminonstruktur würde das Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin **54** entstehen (Schema 3-8, I). Erfolgt der Angriff jedoch über den N1-Stickstoff des Pyrimidins, würde sich das Pyrimido[1,6-*a*]pyrimidin **55** (Schema 3-8, II) bilden.

Gemäß der zitierten Quelle weist das isolierte Produkt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum neben zwei Dubletts für die Pyridin-Protonen und einem Multiplett für die aromatischen Protonen zwei Singulets bei $\delta = 11.51$ und 11.85 ppm auf. Die auftretenden Singulets werden nach H/D-Tausch mit D_2O gelöscht und den beiden NH-Gruppen des Pyrido[2,3-*d*]pyrimidins **54** zugeordnet. Das Strukturisomer **55** wurde somit von den Autoren auf Grund der spektroskopischen Daten ausgeschlossen.

Mögliche weitere Strukturisomere, wie von Vasudevan et al.¹¹¹ in Abhängigkeit der jeweiligen Reaktionsbedingungen beschrieben (Schema 3-7), werden von der Arbeitsgruppe nicht formuliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Entstehung möglicher Isomere diskutiert werden. Dazu wurde das Enaminon **39a** mit den

6-Aminopyrimidinen **44a** und **44b** gemäß den Reaktionsbedingungen in der Literatur¹¹² umgesetzt. Die Struktur der so erhaltenen Produkte wurde anschließend mit Hilfe spektroskopischer Methoden untersucht und mit den in der Literatur publizierten Strukturen verglichen.

Mit dem Programm HyperChem lassen sich die Partialladungen der eingesetzten Edukte berechnen. Auf dieser Grundlage können weitere Möglichkeiten der Reaktionsumsetzung formuliert und verschiedene Strukturisomere vorausgesagt werden. Wie bereits oben ausgeführt, weist das C5-Kohlenstoffatom des 6-Aminouracils (**44b**) eine stark negative Partialladung auf, womit dessen nucleophile Eigenschaften zu erklären sind (Abb.: 3-3). Die gefundenen Werte stimmen mit Berechnungen von Troschütz et al.¹¹⁰ überein.

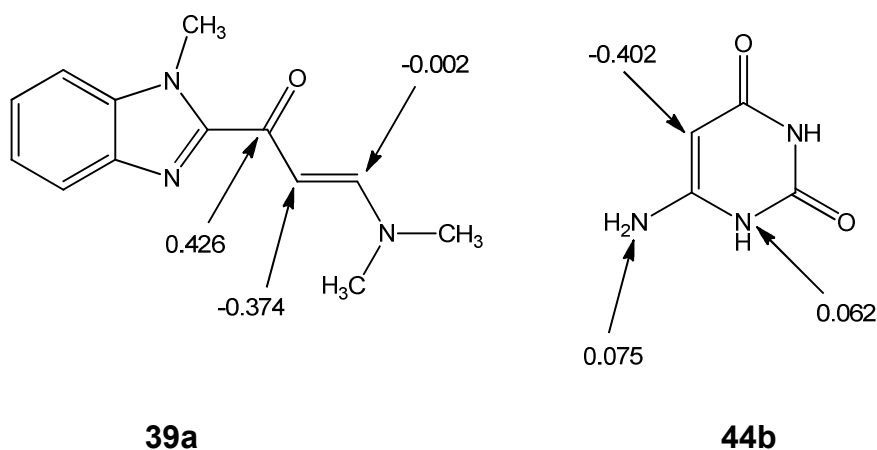
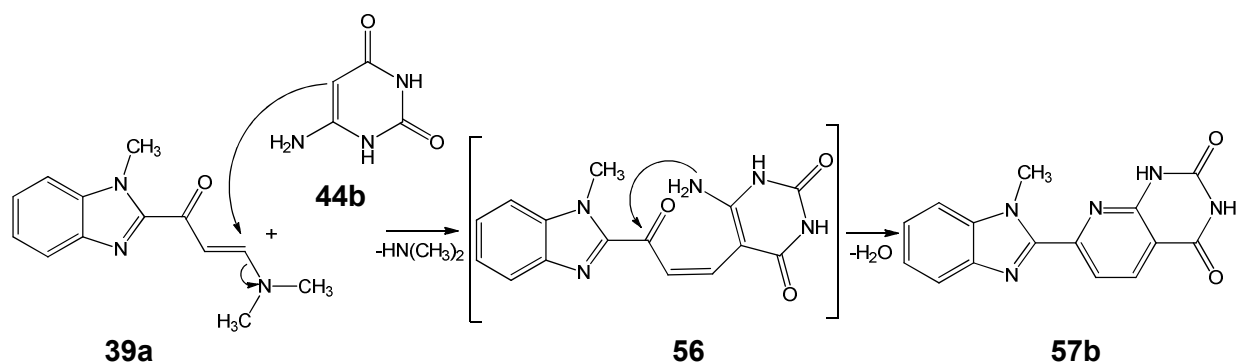


Abbildung 3-3: Berechnete Partialladungen von **39a** und **44b***

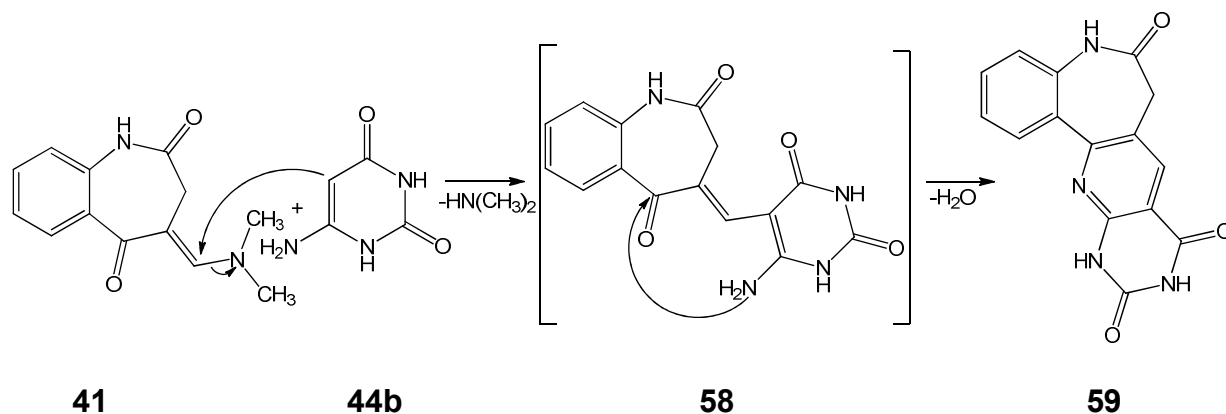
Analog zu Schema 3-5 steht das C5-Kohlenstoffatom des Uracils **44b** für einen nukleophilen Angriff an die Doppelbindung des Enaminons **39a** zur Verfügung. Der anschließende Ringschluss erfolgt über einen zweiten nukleophilen Angriff der exozyklischen Aminogruppe an das Carbonyl-Kohlenstoffatom. Diese Möglichkeit, aus der sich der Reaktionsweg zu dem Reaktionsprodukt **57b** ergibt, wird bei Shaaban et al.¹¹² nicht berücksichtigt (Schema 3-9).

*Die Berechnungen wurden von Dr. Lutz Preu, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, durchgeführt.



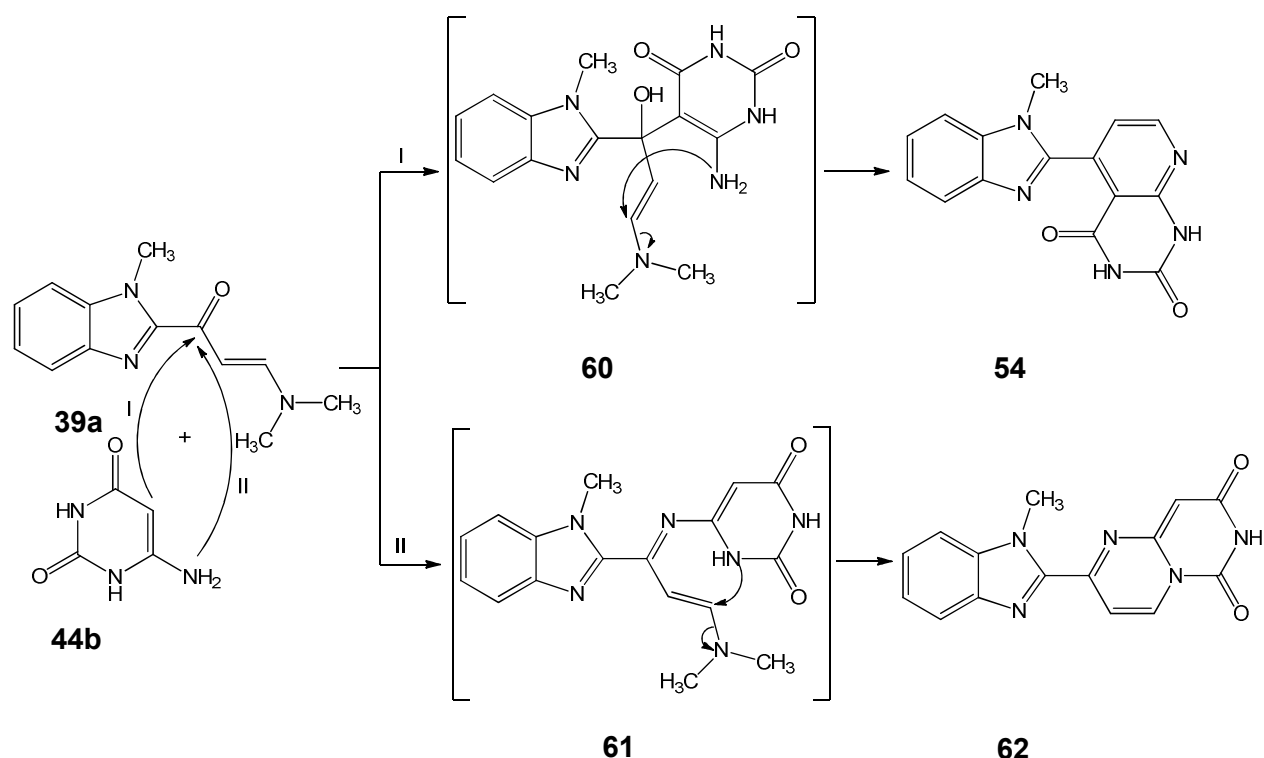
Schema 3-9: Möglicher Reaktionsverlauf zum Produkt **57b**

In Analogie zu der hier diskutierten Reaktion wurde von Egert-Schmidt¹¹³ die Darstellung von 7,12-Dihydro-5*H*-pyrimido[5',4':5,6]pyrido[3,2-*d*][1]benzazepin-6,9,11-(10*H*)-trion (**59**) ebenfalls über die Addition des nukleophilen Uracil-C5 von 6-Aminouracil (**44b**) an die Doppelbindung des Enaminons **41** formuliert (Schema 3-10). Von dem Zwischenprodukt **58** ausgehend erfolgte der Ringschluss durch Angriff der exozyklischen Aminogruppe an dem Carbonyl-Kohlenstoff der Enaminonteilstruktur. Die Konstitution des isolierten Produktes **59** konnte Egert-Schmidt¹¹³ mittels spektroskopischer Untersuchungen absichern.



Schema 3-10: Umsetzung der Edukte **41** und **44b** nach Egert-Schmidt¹¹³

Alternativ könnte auch ein initialer Angriff des Uracil-Kohlenstoffatoms C5 am Carbonylkohlenstoff des Reaktionspartners **39a** in Betracht gezogen werden. Der Ringschluss könnte dann über die exozyklische Aminogruppe an die zweite elektrophile Position des Enaminons erfolgen. Die entstehende Verbindung entspräche der von Shaaban et al.¹¹² postulierten Struktur **54** (Schema 3-11).



Schema 3-11: Mögliche Strukturisomere **54** und **62**

Auch die primäre Anlagerung der exozyklischen Aminogruppe an den Carbonyl-Kohlenstoff wäre denkbar. Der anschließende Ringschluss könnte über den N1-Ringstickstoff des Uracils erfolgen und über die Zwischenstufe **61** zum Produkt **62** führen. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass der Ringschluss von **61** auch über den C5-Uracil-Kohlenstoff erfolgen könnte. Dieser Reaktionsweg würde ebenfalls zur Bildung des Isomers **57b** (Schema 3-9) führen.

Die Reaktionsverläufe mit der Bildung der Produkte **62** und **55** widersprechen einerseits der literaturbekannten besonderen Nukleophilie des 6-Aminouracils an dessen C5-Position und andererseits den spektroskopischen Daten des Produktes, von dem in der Literatur¹¹² berichtet wird.

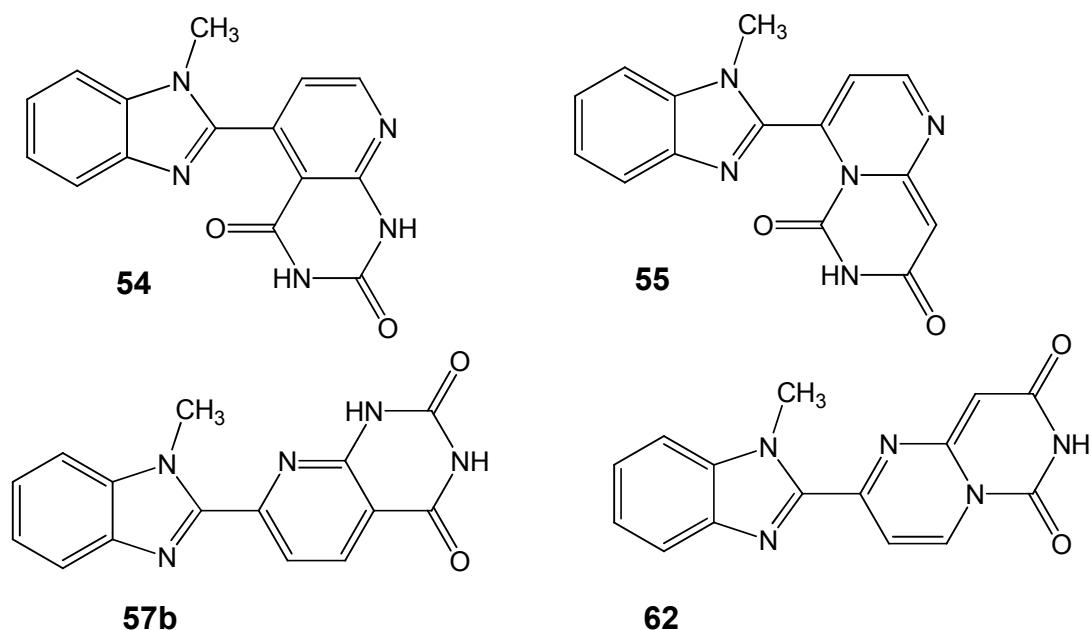


Abbildung 3-4: Mögliche Konstitutionsisomere bei der Reaktion von **39a** mit **44b**

Um zu prüfen, um welches der Konstitutionsisomere **54**, **55**, **57b** und **62** (Abb.: 3-4) es sich bei dem schließlich isolierten Produkt tatsächlich handelt, wurden ein- und zweidimensionale NMR-Spektren der Verbindung ausgewertet. Das isolierte Endprodukt zeigt im ^1H -NMR-Spektrum in $\text{DMSO}-d_6$ zwei Singulets bei $\delta = 11.55$ und 11.87 ppm mit einer Intensität von jeweils einem Proton (Abb.: 3-5). Auf Zugabe von D_2O werden die Protonen gelöscht (Abb.: 3-6). Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist ein primäres, 6 tertiäre und 8 quartäre Kohlenstoffatome auf (Abb.: 3-7).

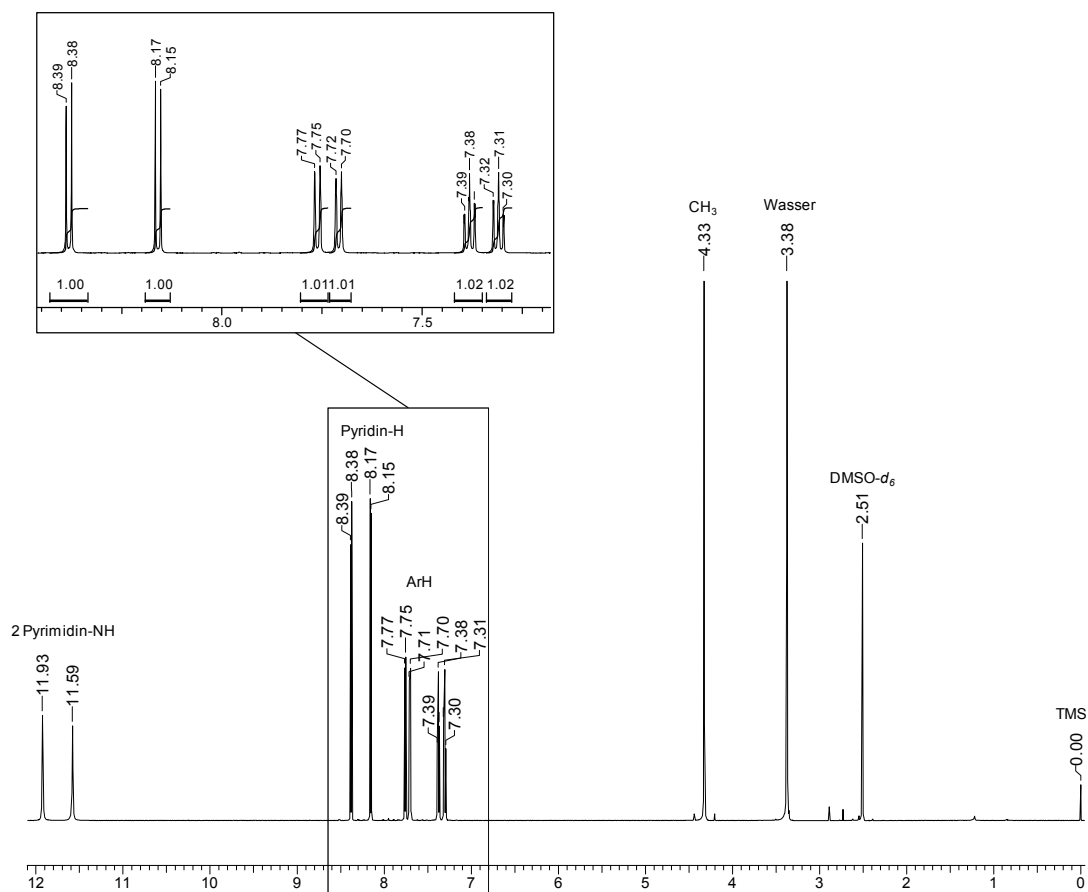


Abbildung 3-5: ¹H-NMR-Spektrum des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b**

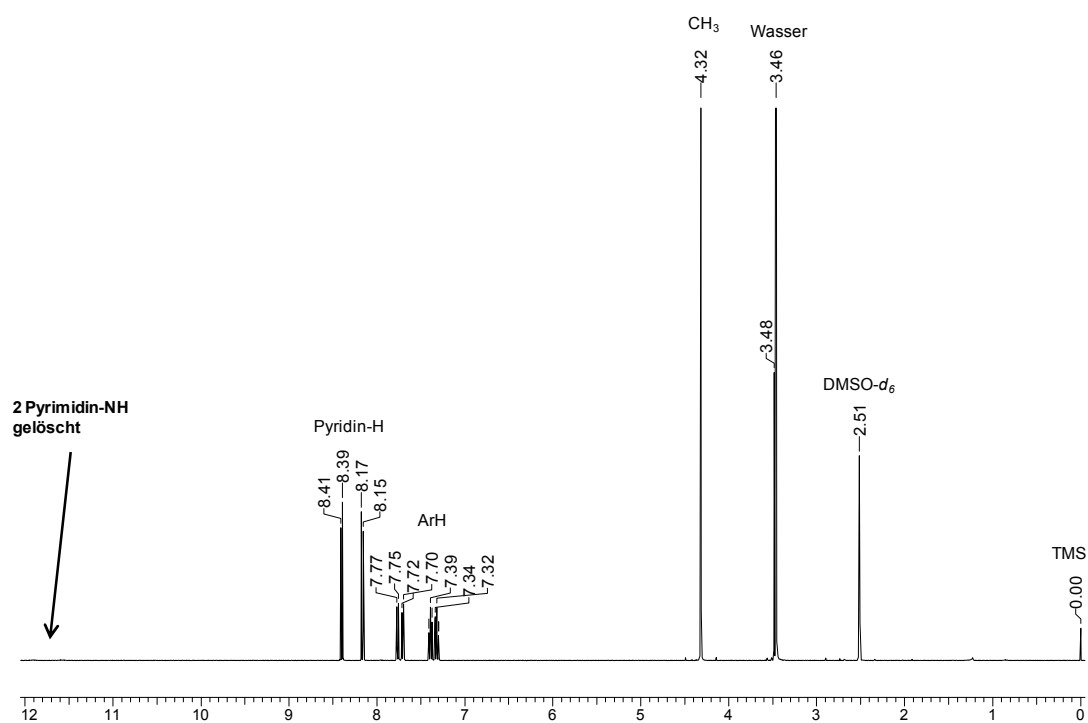


Abbildung 3-6: ¹H-NMR-Spektrum des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b** nach H/D-Tausch

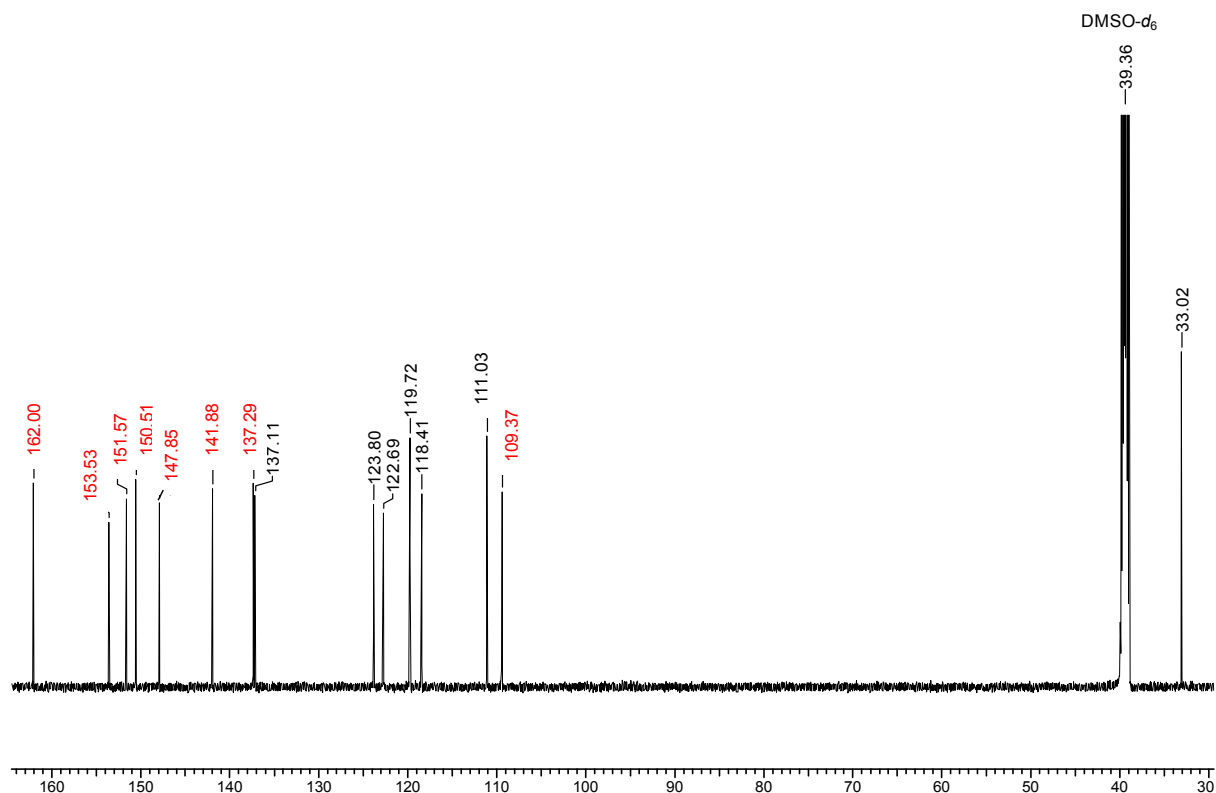


Abbildung 3-7: ^{13}C -NMR-Spektrum des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b** (30-165 ppm) (Quartäre C-Atome sind durch rote Zahlen markiert.)

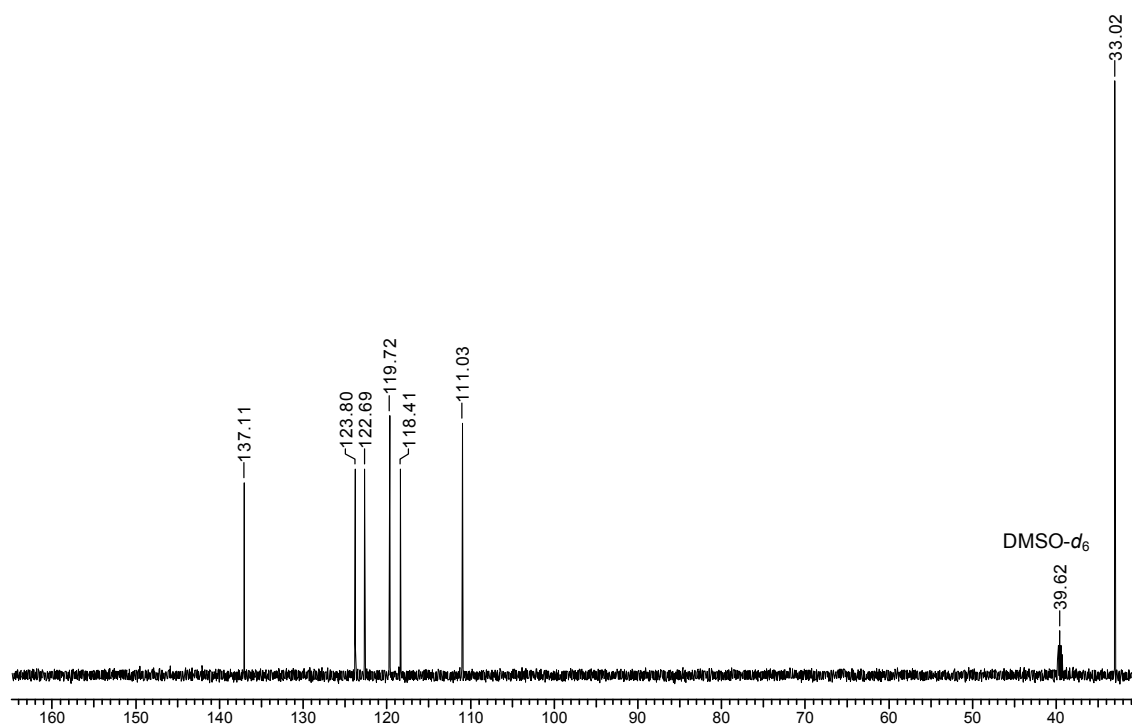


Abbildung 3-8: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b** (30-165 ppm)

Anhand der spektroskopischen Daten kann es sich bei dem isolierten Produkt nur um die Regioisomere **54** oder **57b** handeln (Abb.: 3-9), da **55** und **62** im ^1H -NMR nur ein austauschbares Proton zeigen sollten. Ferner besitzen die beiden so ausgeschlossenen Strukturen je 7 tertiäre und 7 quartäre C-Atome, was mit den ^{13}C -NMR-Spektren nicht im Einklang steht, die 6 tertiäre und 8 quartäre C-Atome zeigen (Abb.: 3-7 und Abb.: 3-8).

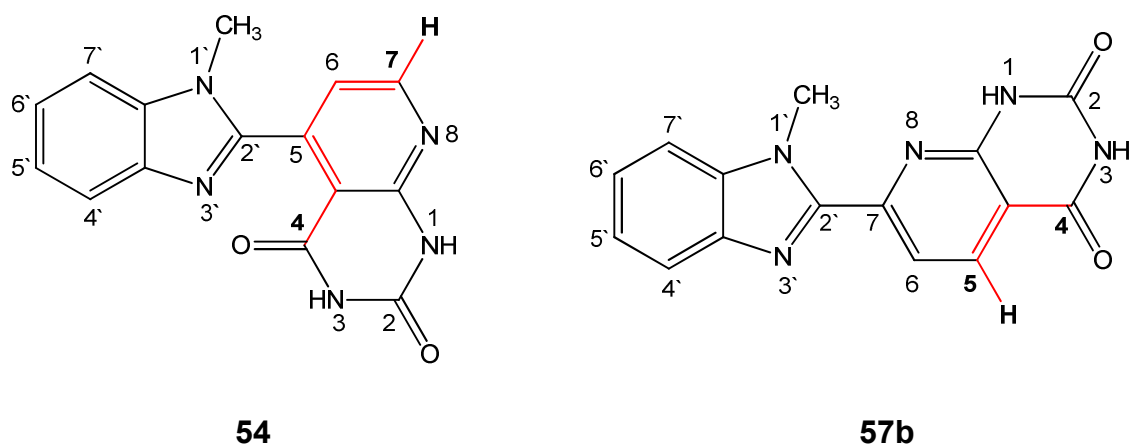
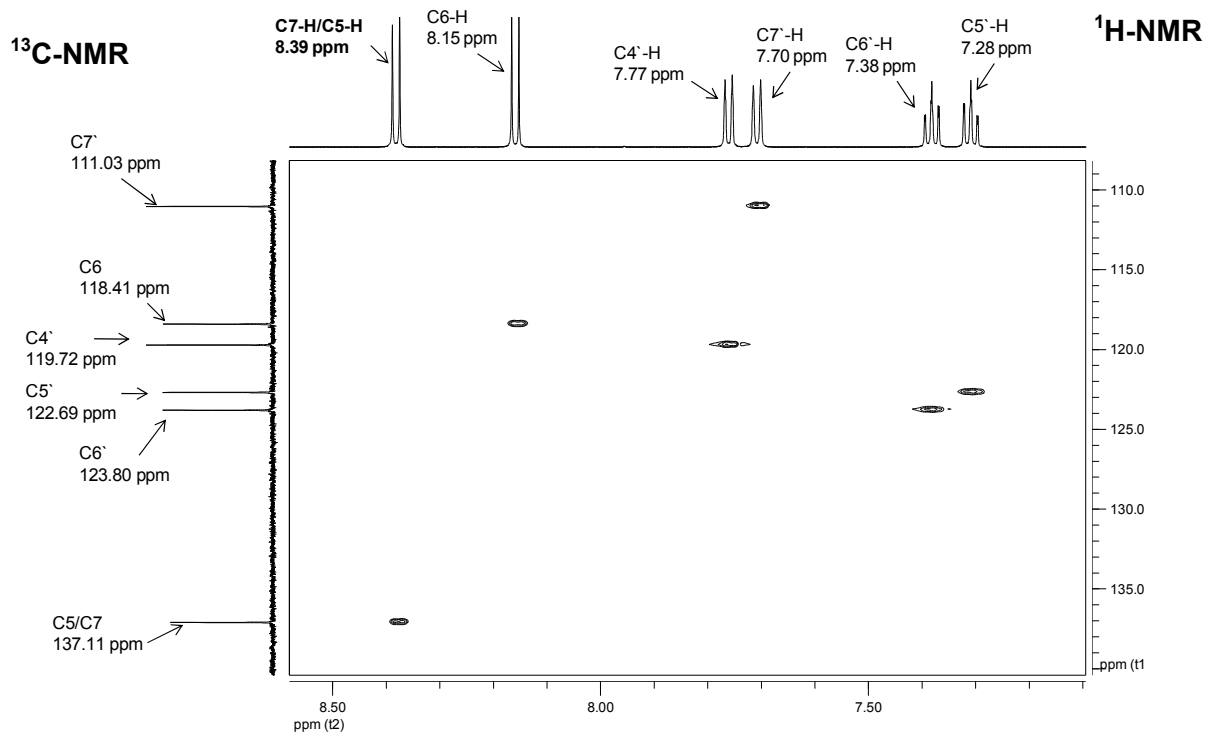
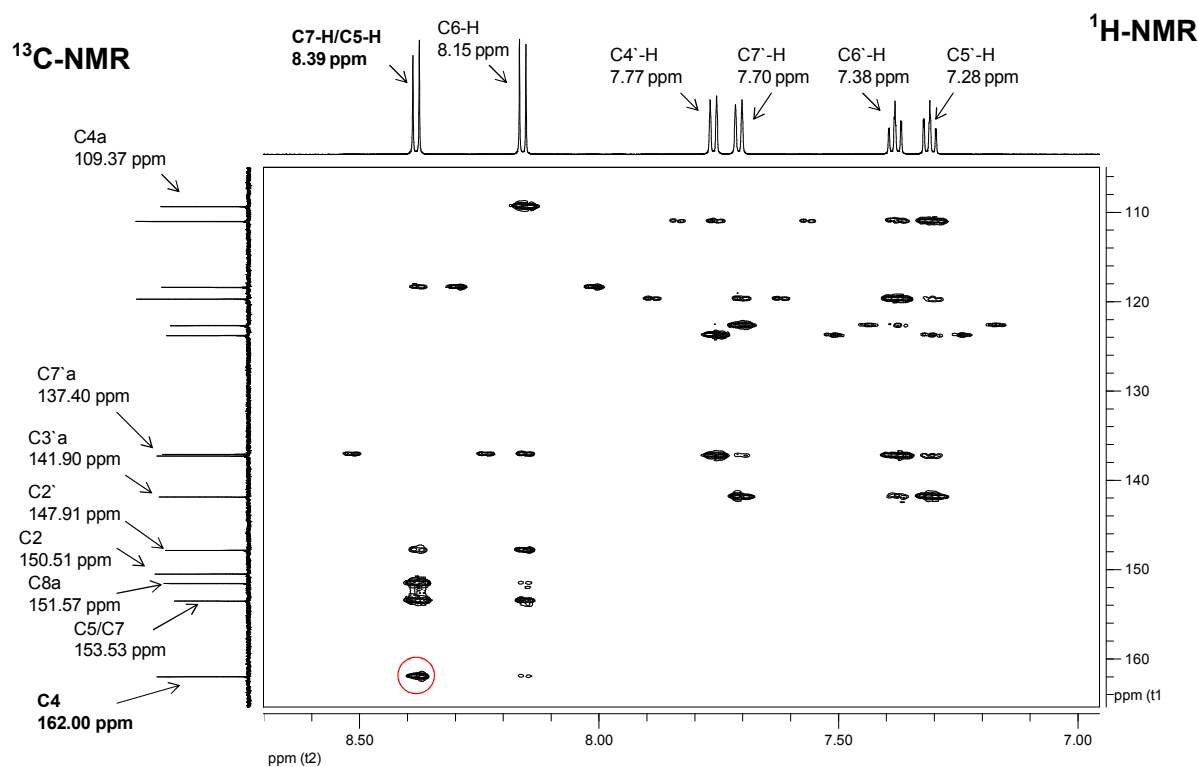


Abbildung 3-9: Mögliche Strukturisomere **54** bzw. **57b** als Produkte der Reaktion von **39a** mit **44b**

Da die noch nicht ausgeschlossenen denkbaren Produkte **54** und **57b** große Ähnlichkeiten in ihren eindimensionalen Spektren aufweisen, war es notwendig, die Strukturaufklärung mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Techniken durchzuführen. Dabei wurde die H,C-Korrelation via ^1J -Kopplung mittels *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) und die H,C-Korrelation via ^nJ -Kopplung sowie die H,N-Korrelation via ^nJ -Kopplung mittels *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) verwendet, wobei die Kopplung über 2 bis 4 Bindungen hinweg dargestellt wird ($n = 2-4$).^{114, 115} Die Abbildung 3-8 zeigt die ^{13}C -Signale der tertiären Kohlenstoffatome der isolierten Verbindung bei 137.11, 123.80, 122.69, 119.72, 118.41 und 111.03 ppm. Das im hohen Feld auftretende Signal bei 33.00 ppm gehört zu dem primären Kohlenstoffatom. Die genaue Zuordnung der tertiären Kohlenstoffatome ergibt sich aus dem HSQC, wobei die Protonen mit den tertiären Kohlenstoffatomen, an die sie direkt gebunden sind, einen Kreuzpeak geben (Abb.: 3-10). Die quartären Kohlenstoffatome können mittels des HMBCs (Abb.: 3-11), die Stickstoffatome über eine H,N-Korrelation im HMBC (Abb.: 3-12) zugeordnet werden.

Abbildung 3-10: HSQC-Ausschnitt des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b**Abbildung 3-11: HMBC-Ausschnitt des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b**

Die entscheidende Korrelation zwischen dem C4-Carbonyl-Kohlenstoff und dem C7- bzw. C5-Pyridin-Proton wurde zur Hervorhebung in der Abbildung 3-11 eingekreist.

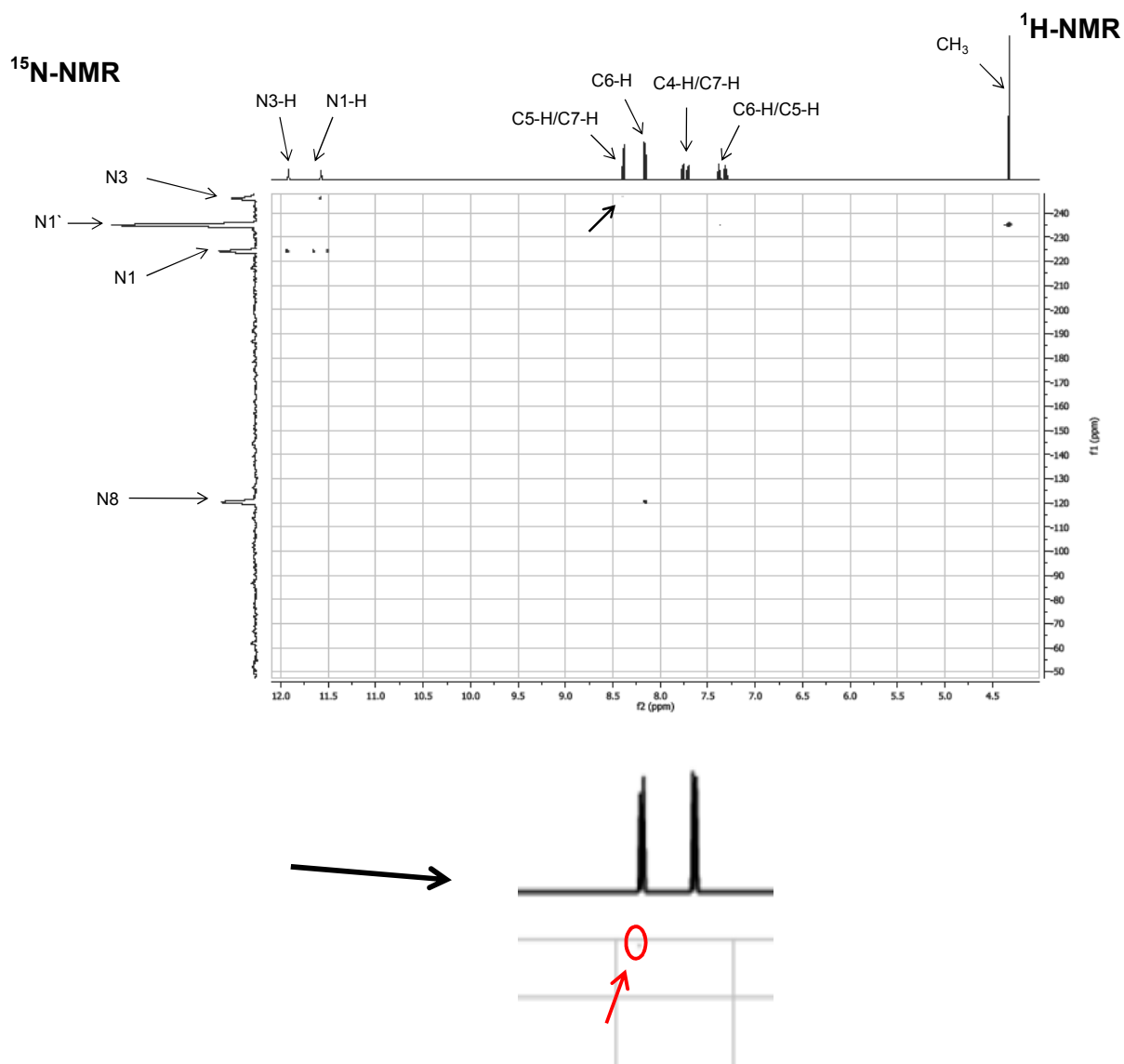


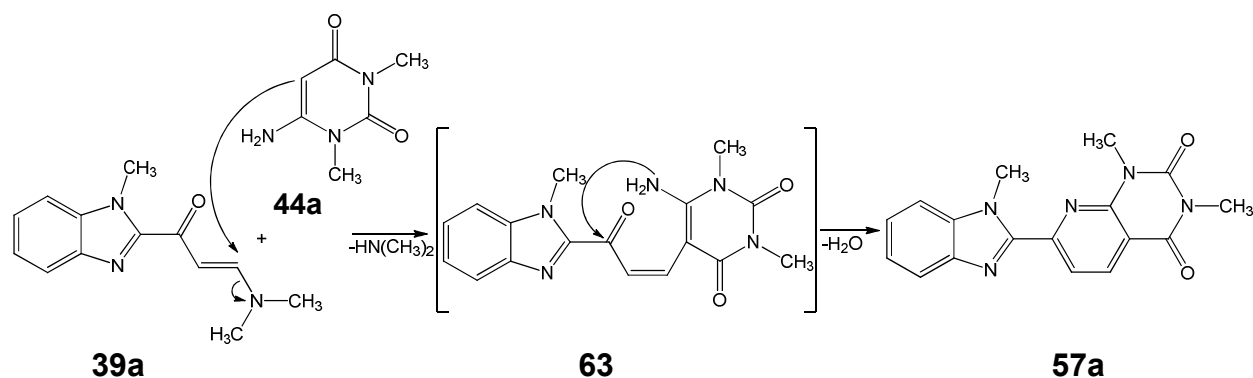
Abbildung 3-12: N,H-HMBC-Ausschnitt des Produkts der Reaktion von **39a** mit **44b** (-50- -245 ppm)

Die ebenfalls beweiskräftige Korrelation zwischen dem N3-Imidstickstoff und dem C5/C7-Pyridin-Proton wurde mit einem Pfeil markiert und, da der Kreuzpeak nur sehr schwach ist, stark vergrößert dargestellt (Abb.: 3-12).

Die Auswertung der zweidimensionalen Spektren der HMBC und HSQC ergibt für beide Konstitutionsisomere **54** und **57b** eine eindeutige Zuordnung der Kohlenstoffatome. Entscheidend für die Unterscheidung der Konstitutionsisomere ist das Auftreten einer deutlichen Korrelation zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoffatom C4 bei 162.00 ppm und dem Pyridin-Proton an Position C5 des Isomers **57b** bzw. an C7

der Verbindung **54** (rot markierte Bindungen in Abb.: 3-9). Ein eindeutiges Kreuzsignal ist lediglich zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff C4 und dem Proton in Position 5 des Konstitutionsisomers **57b** möglich, da die Korrelation über drei Bindungen erfolgt. Das von Shaaban et al.¹¹² postulierte Strukturisomer **54** würde nur ein sehr schwaches Signal zeigen, da die Korrelation des Pyridin-Protons an C7 zum Carbonyl-Kohlenstoff an C4 über 5 Bindungen hinweg erfolgt. Zusätzlich konnte auch mittels des N,H-HMBCs eine Unterscheidung der Konstitutionsisomere erfolgen. Das Pyridin-Proton in Position C5 der Verbindung **57b**, ¹H-NMR bei 8.39 ppm, zeigt eine schwache Korrelation mit dem Signal des Imid-Stickstoffs bei -247 ppm über vier Bindungen hinweg. Das Strukturisomer **54** würde ausgehend vom Pyridin-Proton C7 zum Imid-Stickstoff keinen Kreuzpeak zeigen, da die Korrelation über 6 Bindungen hinweg erfolgt. Das abgebildete N,H-HMBC-Spektrum stellt einen Ausschnitt des gesamten Spektrums dar, in dem der sehr schwache Kreuzpeak der entscheidenden Korrelation durch einen Pfeil markiert ist. Es konnten alle Stickstoffe detektiert werden, wobei sich der fünfte Stickstoff im Bereich von -330 ppm befindet. Insgesamt sprechen die Erkenntnisse der spektroskopischen Untersuchungen eindeutig für die von mir angenommene Struktur **57b** und gegen die in der Literatur¹¹² postulierte Struktur **54**.

Bei der Umsetzung des Enaminons **39a** mit 6-Aminouracil (**44b**) konnte nur ein amorphes Material des Produktes **57b** isoliert werden, das sich nicht für eine Röntgenstrukturanalyse eignete. Jedoch führte die Umsetzung des Enaminons **39a** mit 6-Amino-1,3-dimethyluracil (**44a**) zu einem farblosen, kristallinen Produkt (Schema 3-12), dessen Kristalle eine für die Röntgenstrukturanalyse hinreichende Qualität aufwiesen.



Schema 3-12: Umsetzung der Edukte **39a** und **44a**

Das ^1H -NMR-Spektrum entspricht bis auf die zusätzlichen Signale der Methylsubstituenten weitgehend dem Spektrum des unsubstituierten Produkts. Da Verbindung **57a** in den üblichen Lösungsmitteln schlecht löslich ist, konnte kein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen werden. Im ^{13}C -DEPT-NMR in $\text{DMSO-}d_6$ konnten drei Signale bei 28.5, 29.9 und 34.2 ppm den primären Kohlenstoffatomen und die Signale bei 113.6, 115.6, 120.3, 126.8, 127.2, 139.4 ppm den 6 tertiären Kohlenstoffatomen zugeordnet werden.

Das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse dieser Verbindung (Abb.: 3-13) bestätigte abschließend die Annahme der postulierten Struktur und damit indirekt auch diejenige der analogen Verbindung **57b**.

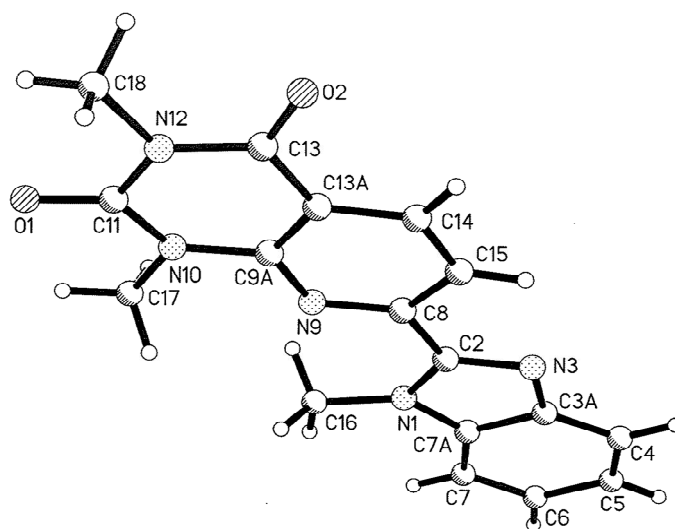


Abbildung 3-13: Röntgenstruktur von 1,3-Dimethyl-7-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**57a**)*

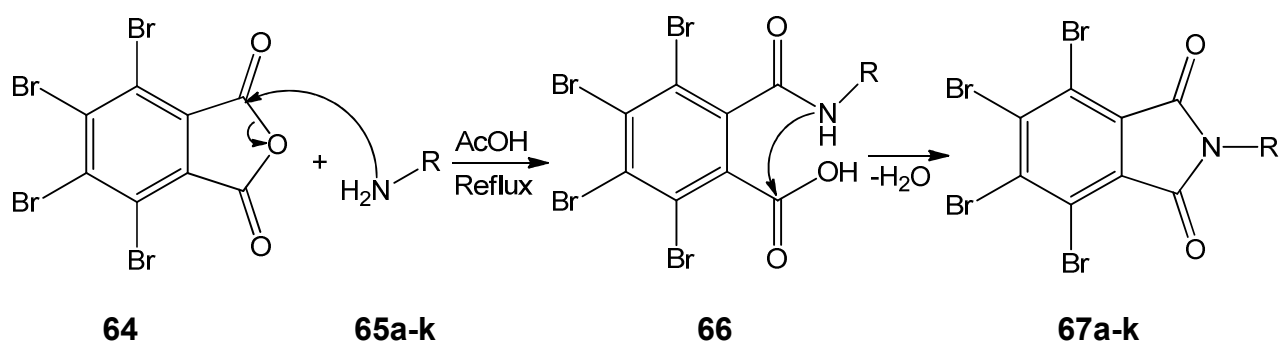
*Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC- Nomenklatur.

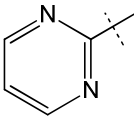
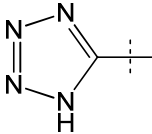
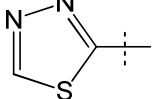
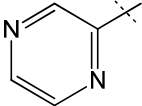
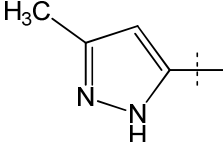
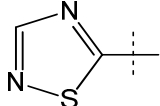
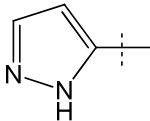
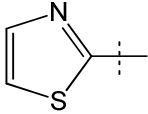
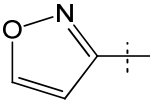
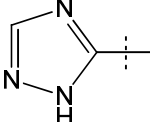
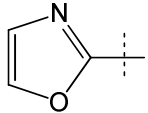
3.3 Darstellung der Tetrabromisindole **67**

Als zweite Verbindungsklasse neuer Proteinkinase-Inhibitoren sollten die Tetrabromisindole **67** synthetisiert werden.

3.3.1 Synthese der 2-Aryl-4,5,6,7-tetrabrom-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-dione

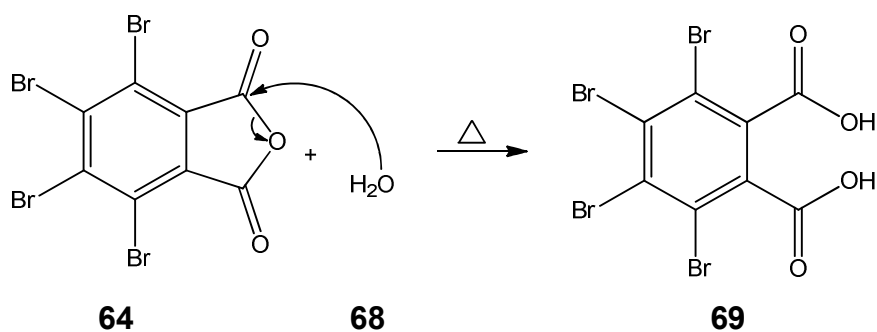
Die Darstellung der N2-substituierten 4,5,6,7-Tetrabrom-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-dione **67** erfolgte nach einer von Pratt et al.¹¹⁶ beschriebenen Methode. Dazu wurde in einer Eintopfreaktion Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**) in äquimolarem Verhältnis mit einem primären heterozyklischen Amin **65** in Eisessig zum Rückfluss erhitzt (Schema 3-13). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur fiel das Produkt aus dem Reaktionsansatz aus. Der isolierte Niederschlag sollte mit viel Wasser gewaschen werden, da vorhandene anorganische Verunreinigungen die anschließende Reinigung stören. Auf Grund der schlechten Löslichkeit der Tetrabromisindole **67** wurde das isolierte Produkt entweder durch einfaches Aufkochen in Aceton oder durch Soxhlet-Extraktion gereinigt. Bei der letztgenannten Methode handelt es sich um eine kontinuierliche Extraktion des Reaktionsproduktes mit einem organischen Lösemittel zur Isolierung des reinen Produktes. Nachteilig an dieser Methode war der hohe zeitliche Aufwand. Der Versuch die Produkte säulenchromatographisch zu reinigen, führte zur Zersetzung auf der Säule.



R		R		R	
a		e		i	
b		f		j	
c		g		k	
d		h			

Schema 3-13: Darstellung der 2-Aryl-4,5,6,7-tetrabrom-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dione (**67**)¹¹⁶

Die Reaktionszeiten betrugen in Abhängigkeit des eingesetzten Amins 1-3 h. Bei wenig reaktiven Aminen kommt bei längerer Reaktionsdauer die Hydrolyse des Tetrabromphthalsäureanhydrids **64** als Nebenreaktion in Frage (Schema 3-14).



Schema 3-14: Mögliche Nebenreaktion des Phthalsäureanhydrids **64**

Unter den genannten Reaktionsbedingungen konnten nicht alle Tetrabrom-1*H*-is-indole **67a-l** erfolgreich synthetisiert werden. Bei der Umsetzung von **65a**, **e** und **h** wurden nur Gemische aus Edukten und Produkt isoliert, die sich jedoch nicht trennen ließen.

3.3.2 Spektroskopische Untersuchung von **67f**

67f zeigt im ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) in $\text{DMSO-}d_6$ ein Singulett bei $\delta = 2.3$ ppm (Intensität 3H) sowie ein Multiplett bei $\delta = 6.1$ ppm und ein Dublett bei $\delta = 12.9$ ppm mit $J = 2.1$ Hz mit einer Intensität von jeweils einem Proton (Abb.: 3-14). Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist ein primäres, ein tertiäres und 6 quartäre Kohlenstoffatome auf. Vergleicht man das ^1H -NMR mit Voraussagen computergestützter Programme, die auf ^1H -Datenbanken beruhen (ChemBioDraw Ultra 12.0, CambridgeSoft Corporation, 2010 und MestReNova 6.0.3, 2009 Mestrelab Research S.L. Chemistry Software Solution), sollte **67f** im ^1H -NMR-Spektrum drei Singulets bei $\delta = 2.4$, 6.0 und 11.1 ppm mit einer Intensität von jeweils einem Proton aufweisen.

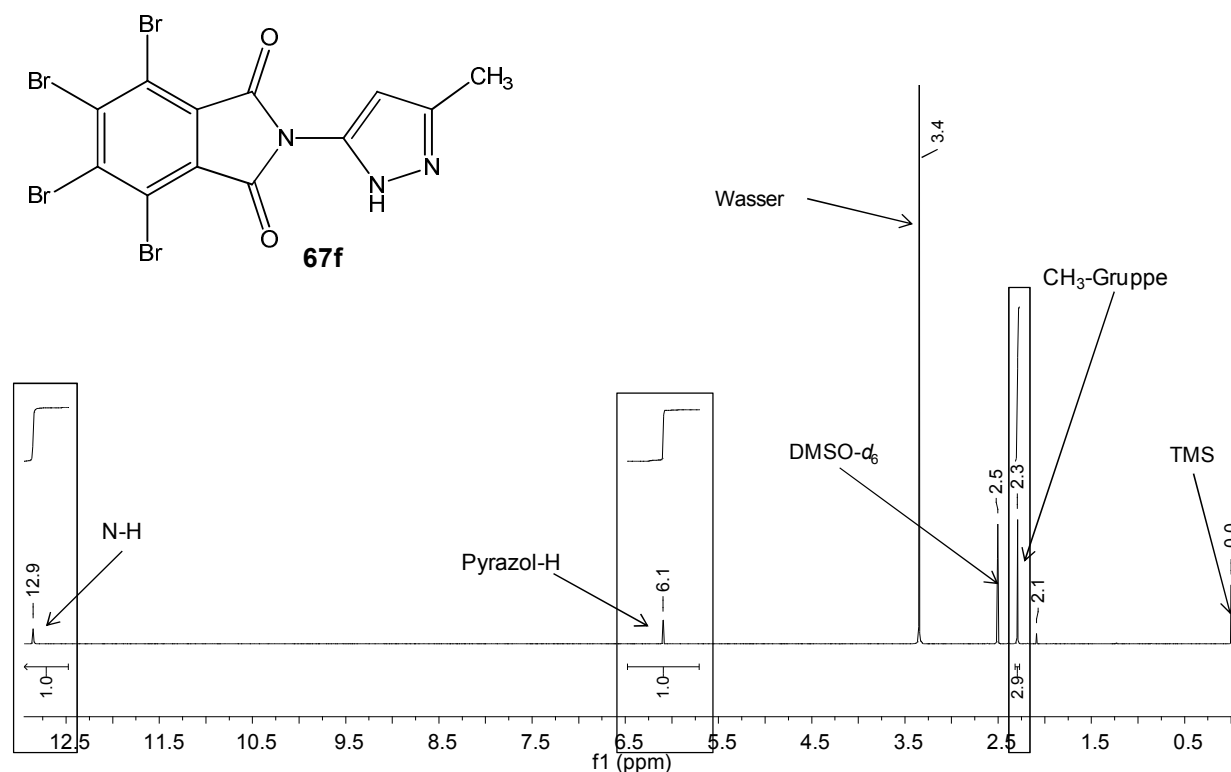


Abbildung 3-14: ^1H -NMR von Verbindung **67f**

Das ^1H -NMR-Spektrum wurde auf Grund der oben beschriebenen spektroskopischen Daten einer GSD-Analyse (*global spectral deconvolution*) unterzogen. Diese von MestReNova geführte Funktion ermöglicht es, Signalüberlappungen zu verdeutlichen. Durch mathematische Dekonvolution wird die digitale Auflösung breiter überlagerter Peaks so weit verbessert, dass die zugrundeliegende Feinstruktur sichtbar wird. Dabei konnte durch Entfaltung der Signale ein doppelter Signalsatz sichtbar gemacht werden. Die relevanten Signale (Kästen) wurden vergrößert herausgearbeitet und im direkten Vergleich den bearbeiteten Signalen gegenübergestellt (Abb.: 3-15).

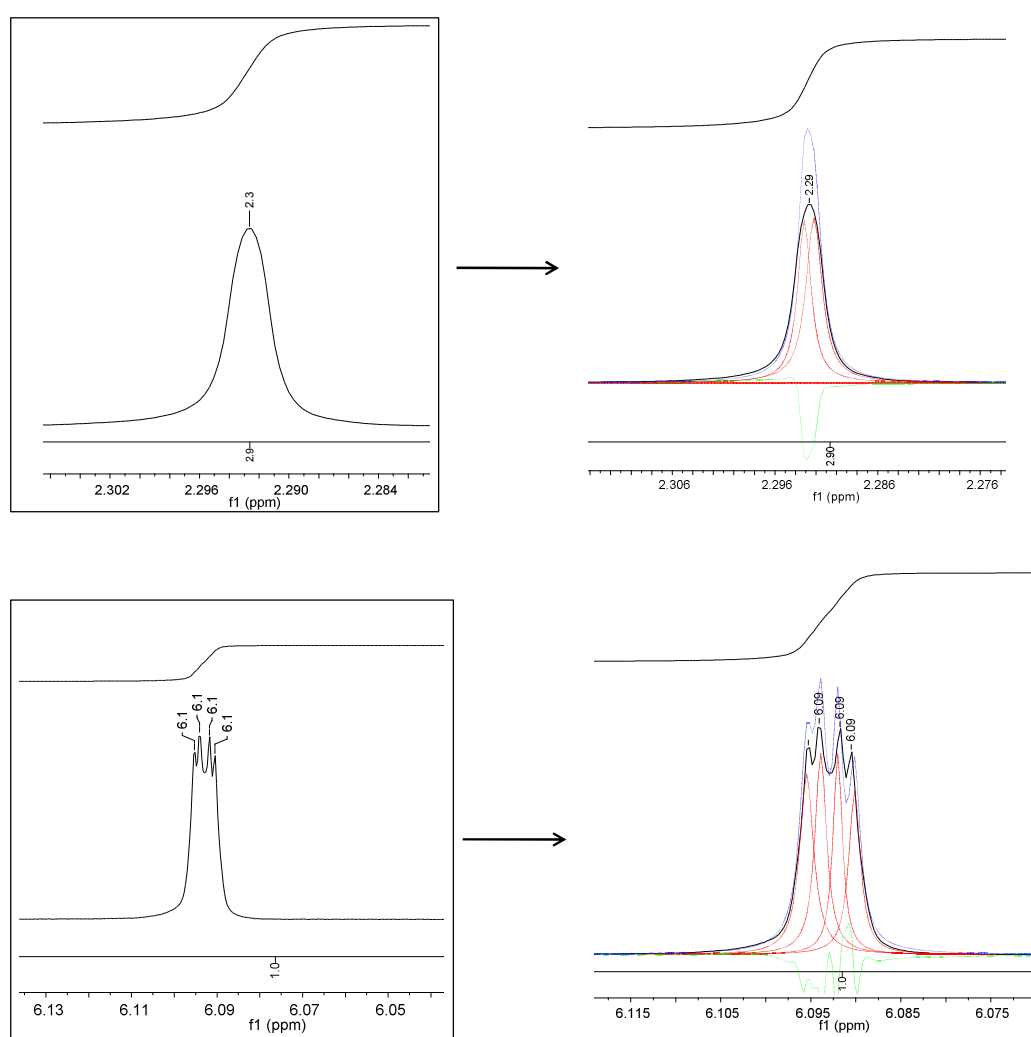


Abbildung 3-15: Vergrößert herausgearbeitete Signale aus dem ^1H -NMR von **67f** vor und nach GSD-Analyse

■: Summe des Signals; ■: berechnete Peaks; ■: Restfläche

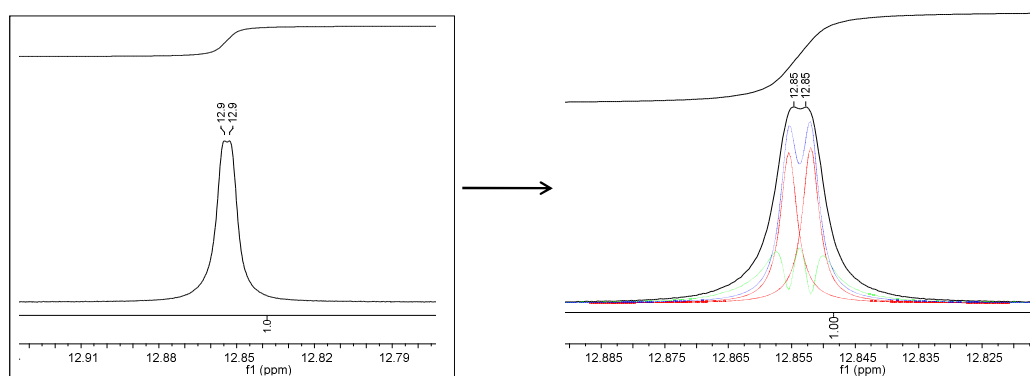


Abbildung 3-15: Vergrößert herausgearbeitete Signale aus dem ^1H -NMR von **67f** vor und nach GSD-Analyse (Fortsetzung)

■: Summe des Signals; ■: berechnete Peaks; ■: Restfläche

Für das Multiplett-Signal des Pyrazolprotons bei $\delta = 6.09$ ppm wurde nach Berechnung ein Aufspaltungsmuster von zwei Dublett-Signalen sichtbar. Es findet eine Kopplung vom aromatischen Proton über drei Bindungen zum Stickstoffproton statt. Dabei bilden das erste und dritte Signal und das zweite und vierte Signal ein Dublett mit jeweils einer Kopplungskonstanten von $J = 2.2$ Hz. Das Dublett bei $\delta = 12.85$ ppm ergab nach GSD-Analyse zwei einzelne Singulett-Signale für das Stickstoffproton. Das Singulett bei $\delta = 2.29$ ppm setzt sich aus zwei separaten Singulett-Signalen für die CH_3 -Gruppe zusammen. Eine Erklärung für den doppelten Signalsatz könnte der dynamische Umwandlungsprozess zwischen den beiden tautomeren Formen der Verbindung **67f** in Lösung sein (Abb.: 3-16).

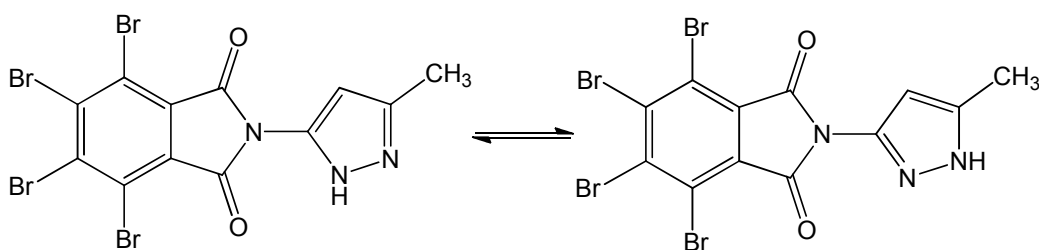


Abbildung 3-16: Tautomere Formen der Verbindung **67f**

Schon Aguilar-Parrila et al.¹¹⁷ haben die Tautomerie verschieden substituierter Pyrazolderivate beschrieben. Der Arbeitsgruppe war es gelungen, das Gleichgewicht des Methylpyrazols mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sichtbar zu machen. Bei einer Temperatur von -20 °C konnte in Hexamethylphosphorsäuretriamid neben 46% 3-Methyl- die Existenz von 54% 5-Methylpyrazol bestimmt werden.

3.3.3 Darstellung der Verbindung 67I

67I wurde aus den Edukten **64** und 2-Aminoimidazoliumsulfat **74** dargestellt (Schema 3-15). Allerdings musste vor der Reaktion die Base 2-Aminoimidazol aus dem Kation freigesetzt werden.¹¹⁸ Da **74** eine Guanidinium-Teilstruktur besitzt, wurden die basischen Eigenschaften der freien Base des 2-Aminoimidazoliums (**71**) mit den pK_s-Werten verschieden substituierter Imidazolium- und Guanidinium-Ionen verglichen (Abb.: 3-17).¹¹⁹

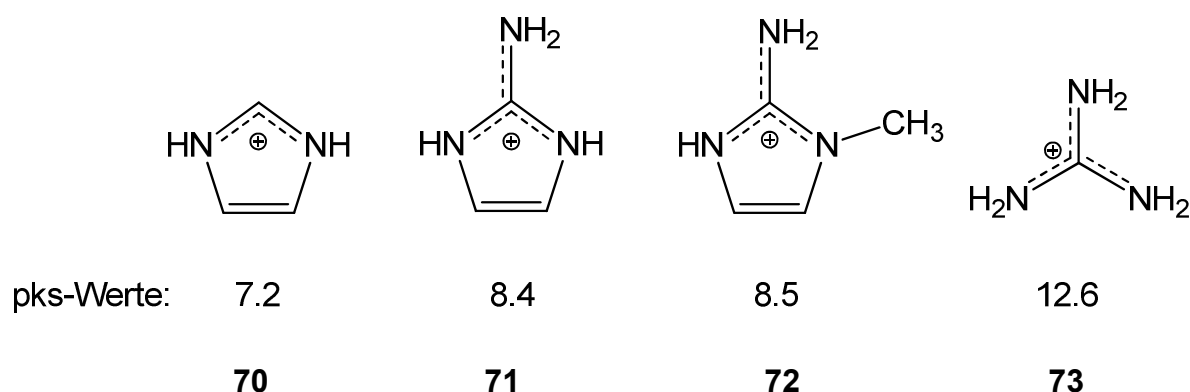


Abbildung 3-17: pK_s-Werte verschieden substituierter Amidinium- und Guanidinium-Kationen

Die Basizität des 2-Aminoimidazols ist durch den pK_s-Wert der korrespondierenden Kation-Säure (**71**) von 8.4 charakterisiert. Aus diesem Grund erschien der Einsatz eines stark basischen Reagenzes zur Freisetzung des 2-Aminoimidazols sinnvoll. 1,8-Diazobicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, **75**) wird in der Literatur als starke organische Base mit einer Amidin-Teilstruktur beschrieben (Abb.: 3-18) und findet Anwendung in organischen Synthesen als Katalysator, Komplexligand und nicht-nukleophile Base.¹²⁰ Die sterisch gehinderte Amidin-Base besitzt einen pK_s-Wert von 12.

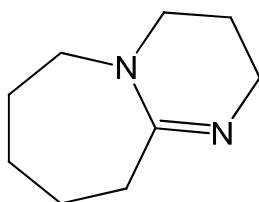
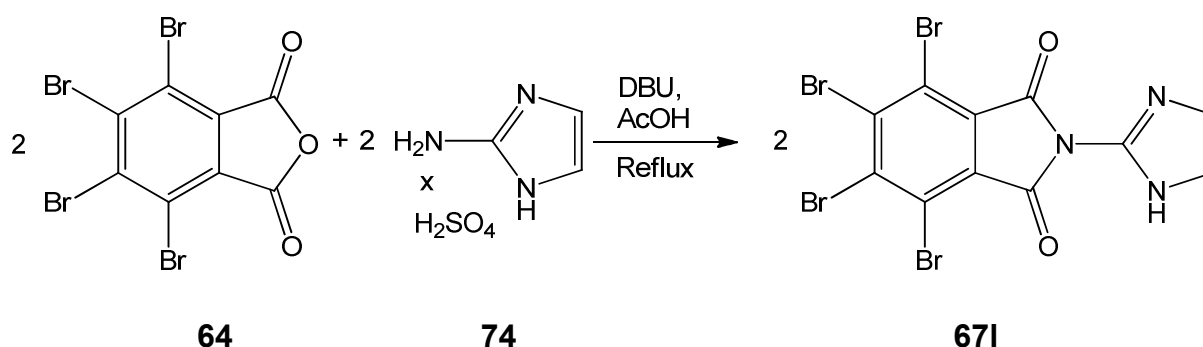


Abbildung 3-18: Struktur des DBUs (**75**)

Zur Synthese von Verbindung **67I** wurde abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift eine Mischung aus äquimolaren Anteilen von 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**), 2-Aminoimidazolsulfat (**74**) und 1.5 Äquivalenten DBU **75** in Eisessig zum Rückfluss erhitzt. Dabei ist darauf zu achten, dass vor Reaktionsbeginn das Edukt **74** mit der zugesetzten Base **75** für wenige Minuten in Eisessig gerührt wird, und anschließend das Phthalsäureanhydrid **64** portionsweise zum Reaktionsansatz gegeben wird. Versuche haben gezeigt, dass das gleichzeitige Erhitzen aller Komponenten nicht zu befriedigenden Ergebnissen führt (Schema 3-15).



Schema 3-15: Darstellung der Verbindung **67I**

Das schwer lösliche Produkt **67I** wurde mittels Soxhlet-Extraktion unter Verwendung von Ethylacetat gereinigt. **67I** zeigt im ¹H-NMR-Spektrum in DMSO-*d*₆ drei Singulets bei δ = 7.04, 7.30 und 12.36 ppm mit einer Intensität von jeweils einem Proton. Das Signal im tiefen Feld kann dem Stickstoff-Proton und die Signale im aromatischen Bereich den Imidazol-Protonen zugeordnet werden (Abb.: 3-19). Im ¹H-NMR-Spektrum würden für die CH-Protonen des Imidazols auf Grund der Spin-Spin-Kopplung der benachbarten Protonen zwei Dubletts mit einer Intensität von einem Proton zu erwarten sein. In der Literatur liegen die Kopplungskonstanten (*J*) der CH-Gruppen des Imidazols im Bereich von 1-2 Hz und werden daher oft nicht aufgelöst.^{121,122}

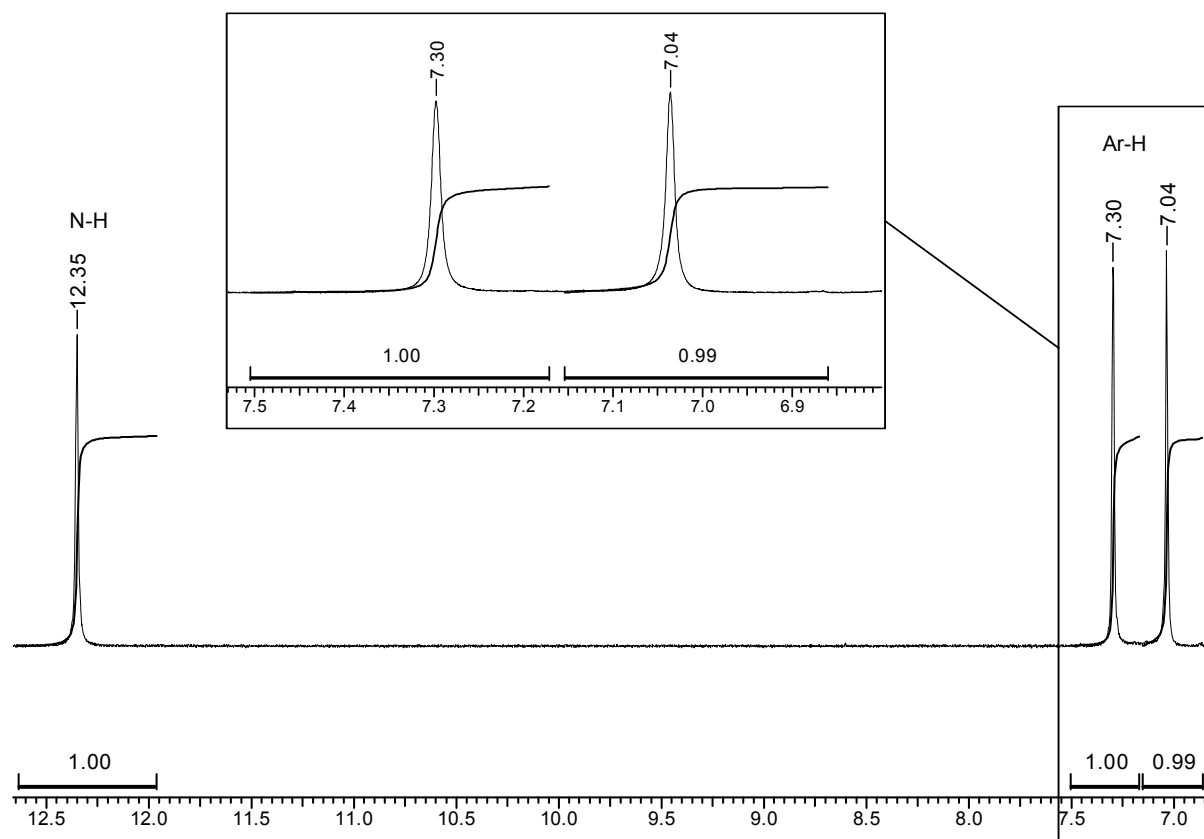
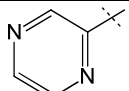
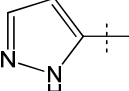
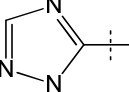
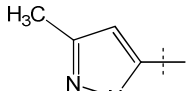
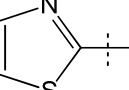
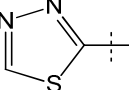
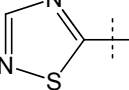
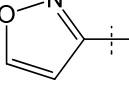
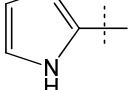


Abbildung 3-19: ^1H -NMR der Verbindung **67I** (6.8–12.6 ppm)

3.3.4 Stabilitätsuntersuchungen an Tetrabromisindolen

Einige der neu synthetisierten Tetrabromisindole **67** zeigten Instabilität nach Lösen in $\text{DMSO-}d_6$. Solche Unbeständigkeiten der gelösten Substanz in polaren protischen Lösungsmitteln erschweren die Durchführung und die Beurteilung biologischer Testungen. Zur Prüfung der Stabilität wurden die Eigenschaften der Substanzen in gelöster Form mittels HPLC- und NMR-Spektroskopie untersucht. Tabelle 3-1 und 3-2 stellen die ermittelten Daten der jeweiligen Verbindung nach Herstellung einer etwa 0.003 M Lösung in $\text{DMSO-}d_6$ und Lagerung bei Raumtemperatur am gleichen Tag, sowie am ersten und sechsten Tag nach Herstellung dar.

Tabelle 3-1: Prozentualer Anteil der Tetrabromisindole **67** nach Lösung in DMSO zu bestimmten Zeitpunkten

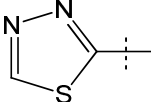
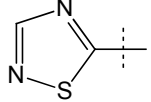
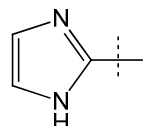
67	R	HPLC^{a,c}		
		0 d^b	1 d	6 d
b		99.7%		98.5%
c		99.2%	99.2%	97.8%
d		97.4%	98.5%	98.4%
f		99.2%	99.1%	98.6%
g		98.4%		97.7%
i		96.6%	94.4%	93.2%
j		90.0%	86.1%	57.2%
k		99.2%		99.1%
l		98.2%		97.8%

^a Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode

^b bestimmt direkt nach Herstellung bzw. am Tag der Herstellung

^c leere Felder: Keine Daten verfügbar

Tabelle 3-2: Signale von Zersetzungsprodukten der Tetrabromisindole **67** nach Lösung in DMSO zu verschiedenen Zeitpunkten

67	R	NMR^{b,c}		
		0 d^a	1 d	6 d
i				8.61 (s, 0.02H), 9.30 (s, 0.09H), 13.44 (s, 0.10H)
j		8.59 (s, 0.03H), 13.86 (s, 0.03H)	8.59 (s, 0.13H), 13.86 (s, 0.14H)	8.59 (s, 0.91H), 13.86 (s, 0.97H)
l			6.81 (s, 0.05H), 6.87 (s, 0.01H)	6.81 (s, 0.17H), 6.87 (s, 0.03H), 7.37 (s, 0.04H)

^a bestimmt am Tag der Herstellung

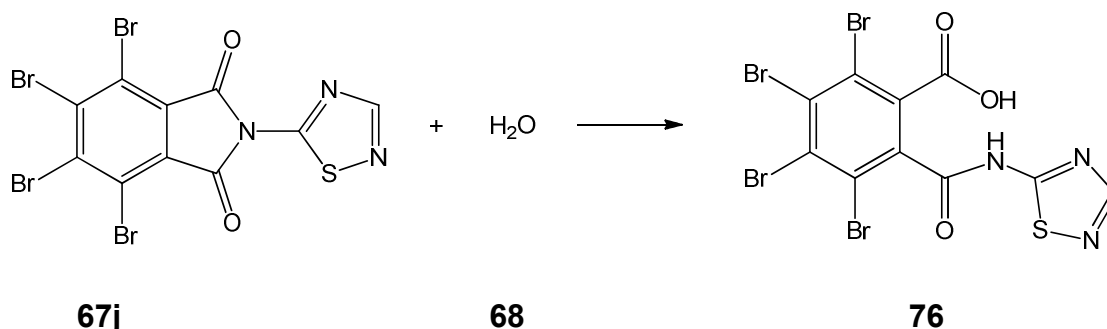
^b δ (¹H) ppm (600 MHz)

^c leere Felder: Keine Daten verfügbar

Alle Verbindungen **67** zeigten bei der sofortigen Vermessung (0 d) der gelösten Substanz in DMSO in Bezug auf alle mittels UV-Detektor nachweisbaren Substanzen einen prozentualen Anteil von >96%. Die Auswertung erfolgte bei 254 nm. Die ermittelten ¹H-NMR-Spektren zeigten sofort nach Herstellung der Lösung neben den zu erwartenden Protonen-Signale keine zusätzlichen unerwünschten Signale für die jeweilige Verbindung. Eine Ausnahme mit knapp 90%igen Substanzanteil bildet **67j**, da sich diese Verbindung offensichtlich schnell zersetzt. **67l** besitzt bei sofortigem Vermessen nach Lösung in DMSO einen prozentualen Anteil von >96%, doch können ab dem ersten Tag zusätzliche Signale geringer Intensität im ¹H-NMR detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme der Thiadiazol-Derivate **67i** und **67j** die untersuchten Verbindungen gelöst in DMSO über eine Woche stabil sind. Das bedeutet, dass sich frisch hergestellte Lösungen der Verbindungen **67b-g** und **67k-l** in DMSO für biologische Testungen eignen, die sich über wenige Stunden oder Tage erstrecken und bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Verbindung **67j** zersetzt sich in DMSO-Lösung dagegen innerhalb weniger Tage. Das nach sechs Tagen aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum einer solchen Lösung deutet auf Zer-

setzung durch Hydrolyse zum Phthalsäuremonoamid **76** hin. Das für die Hydrolyse notwendige Wasser stammt dabei aus dem Lösungsmittel DMSO.



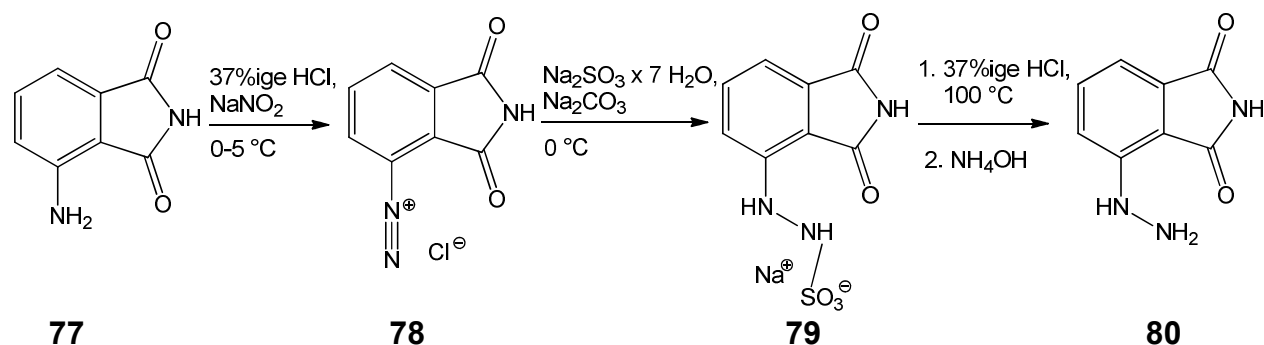
Schema 3-16: Möglicher Hydrolysemechanismus von **67j** nach Lösung in DMSO

3.4 Darstellung der Mini-Indirubine

Die Mini-Indirubine wurden in einer mehrstufigen Synthese dargestellt. Die Ausgangsverbindungen stellen die Aminoisindole **77** und **101** dar, die zunächst zu Hydraziniumchlorid-Derivaten **81** und **102** umgesetzt und anschließend mit verschiedenen Carbonylverbindungen **96** zu Hydrazonen kondensiert wurden. Diese wurden durch Fischer-Indol-Reaktionen zu den gewünschten Indolen weiter umgesetzt.

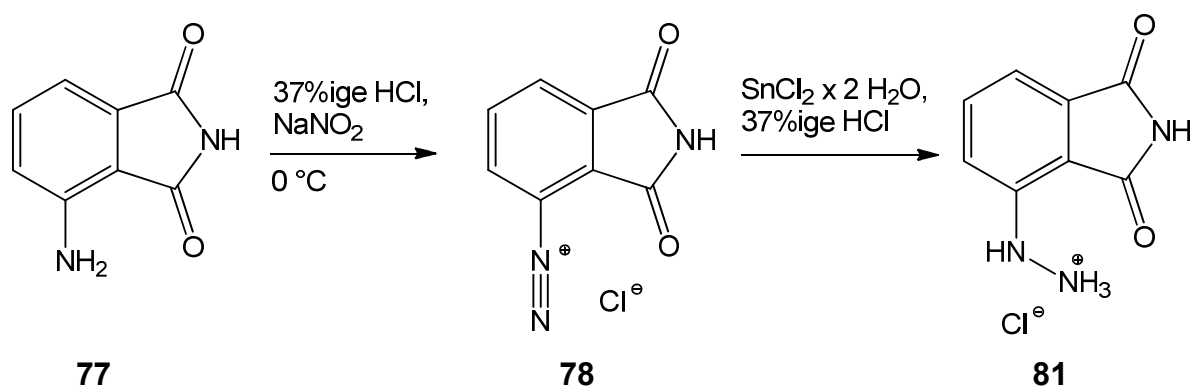
3.4.1 Darstellung des Hydrazinophthalimids

Nach einer modifizierten Vorschrift von Drew und Pearman¹²³ bzw. Cross und Drew¹²⁴ wurde zunächst das Hydrazinophthalimid **80** dargestellt. Dabei wurde das Edukt **77** in halbkonzentrierter Salzsäure suspendiert und mit 1 Äquivalent Natriumnitrit unter Eiskühlung diazotiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine gekühlte Lösung von Natriumsulfit-Heptahydrat und Natriumcarbonat gegeben. Das nach der Fischer-Reduktion erhaltene Schwefelsäurehydrazid **79** wurde mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und das Hydrazin mit Ammoniakwasser ausgefällt (Schema 3-17). Die Ausbeute des Hydrazinophthalimids **80** betrug <10%.



Schema 3-17: Darstellung des Hydrazinophthalimids **80**

In Anlehnung an eine von Pies¹²⁵ modifizierte Vorschrift von Soliman¹²⁶ und unter Zuhilfenahme der Synthesevorschrift von Enders¹²⁷ wurde versucht, die Ausbeute des Hydrazins **80** zu erhöhen. Das aromatische Amin **77** wurde dazu in konzentrierter Salzsäure suspendiert und unter Eiskühlung tropfenweise mit 1.1 Äquivalenten Natriumnitrit zum Diazoniumkation **78** diazotiert. Die anschließende Reduktion erfolgte durch Zugabe der Diazoniumsalz-Lösung zu einer eisgekühlten, salzsauren Zinn(II)chlorid-Dihydrat-Lösung zu **81** (Schema 3-18). Der Reaktionsansatz wurde zum vollständigen Ausfällen des Produktes über Nacht ins Gefrierfach gestellt. Durch diese Methode konnte die Ausbeute auf 65-75% gesteigert werden.

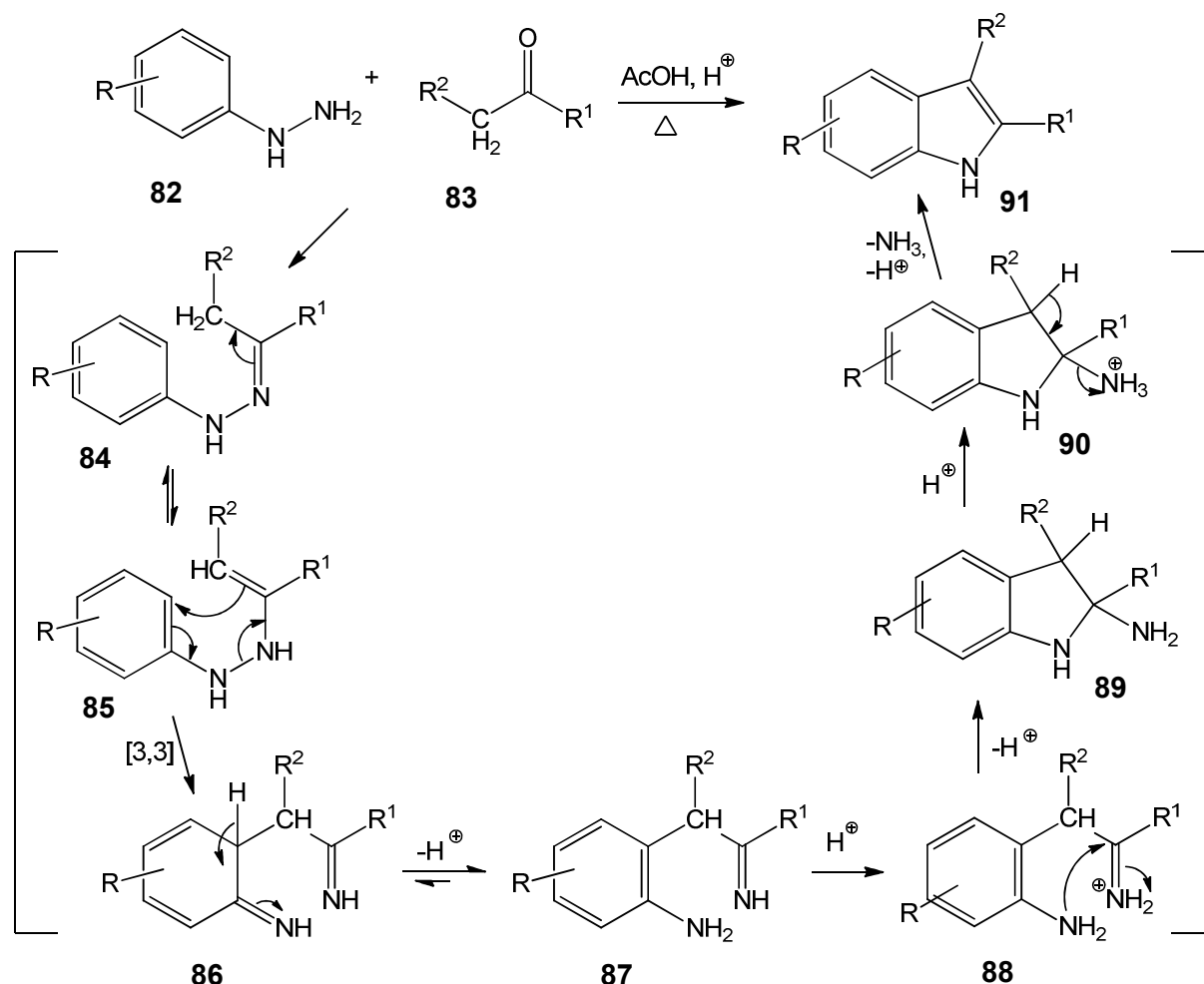


Schema 3-18: Darstellung des Hydrazinophthalimid-Hydrochlorids **81**

3.4.2 Synthese der Pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dione 36

Fischer-Indol-Synthese

Nach der klassischen Fischer-Indol-Synthese wird ein Hydrazon in Gegenwart eines Katalysators unter Eliminierung von Ammoniak umgesetzt (Schema 3-19).¹²⁸

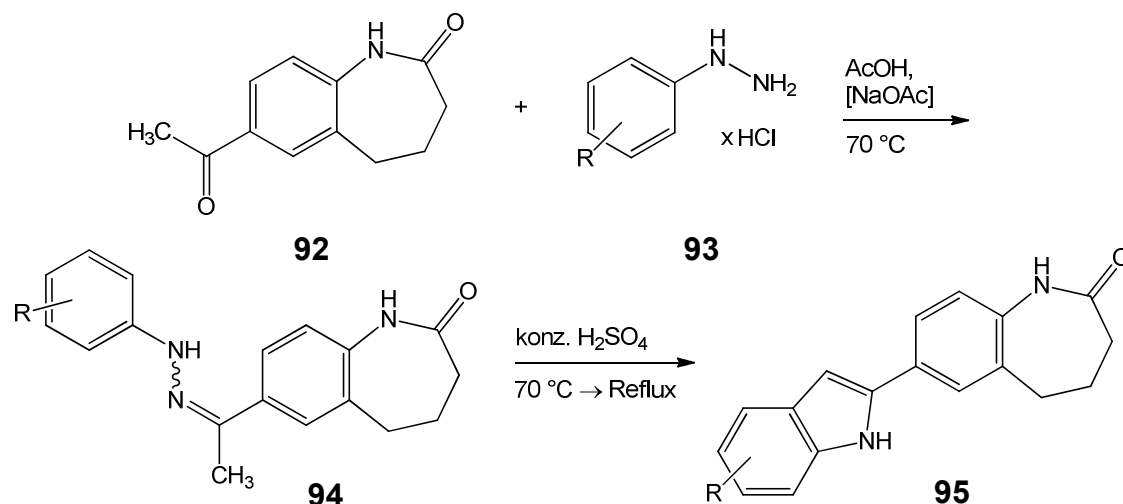


Schema 3-19: Fischer-Indol-Synthese modifiziert nach Robinson et al.¹²⁸

Im ersten Schritt der Fischer-Indol-Synthese erfolgt eine Kondensation von **82** und **83** zum Arylhydrazon **84**. Nach Tautomerisierung von **84** zum Enhydrazin **85** folgt eine *Diaza-Cope*-Umlagerung ([3,3]-sigmatrope Umlagerung) zu **86** und eine weitere Tautomerisierung zum Imin **87**. Durch anschließenden nukleophilen Angriff des Anilinstickstoffs auf das Iminkohlenstoffatom bildet sich intermediär **89**. Im letzten Schritt erfolgt unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms der Ausstoß von Ammoniak zum Produkt **91**.¹²⁸

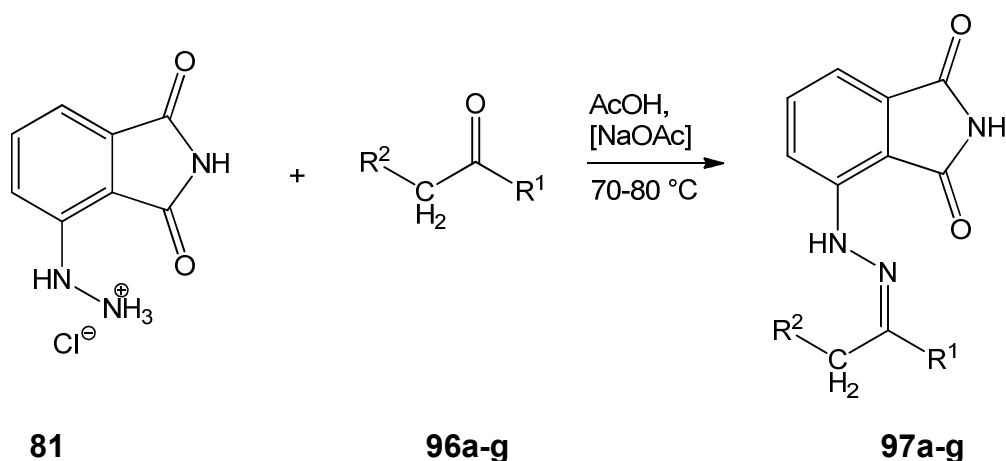
3 Synthese

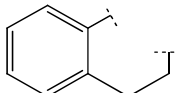
Die Darstellung der Mini-Indirubine erfolgte analog zu einer von Kunick¹²⁹ beschriebenen und von Berger¹⁰⁰ modifizierten Methode für die Durchführung der Fischer-Indol-Synthese. Danach wird in einer Eintopfreaktion das Benzazepinon **92** mit einem Phenylhydrazinhydrochlorid **93** in Eisessig gerührt und nach 1 h mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt (Schema 3-20).



Schema 3-20: Indolisierung von Benzazepinon **92** nach Berger¹⁰⁰

Analog wurde das Hydrazinophthalimid-Hydrochlorid **81** mit 1.5 Äquivalenten des entsprechenden Ketons **96a-g** und 1.5 Äquivalenten Natriumacetat in Eisessig bei 70-80 °C zu den Hydrazonen **97a-g** umgesetzt (Schema 3-21). Nach Reaktionsende wurde der Ansatz auf eine 5%ige Natriumacetat-Lösung gegeben, um die Produktfällung zu vervollständigen.

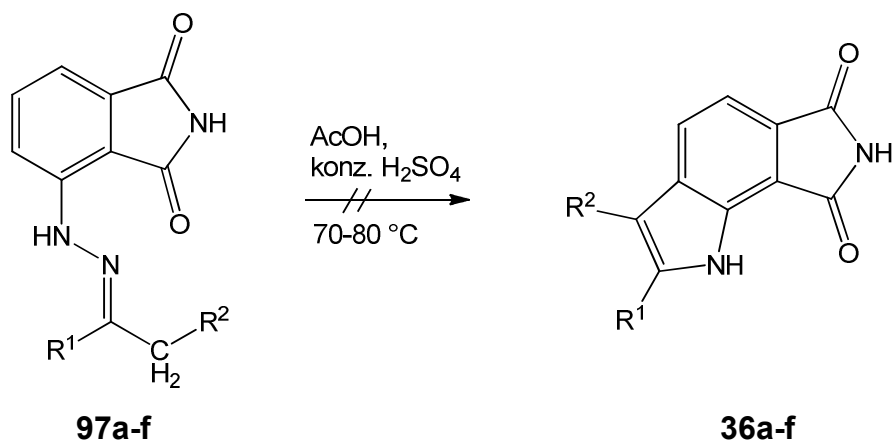


	R¹	R²
a	CH ₃	H
b	C ₆ H ₅	H
c	C ₂ H ₅	CH ₃
d	CH ₃	CH ₃
e	C ₆ H ₅	CH ₃
f	CH ₃	CH ₂ COOH
g		

Schema 3-21: Darstellung der substituierten Hydrazone **97a-g**

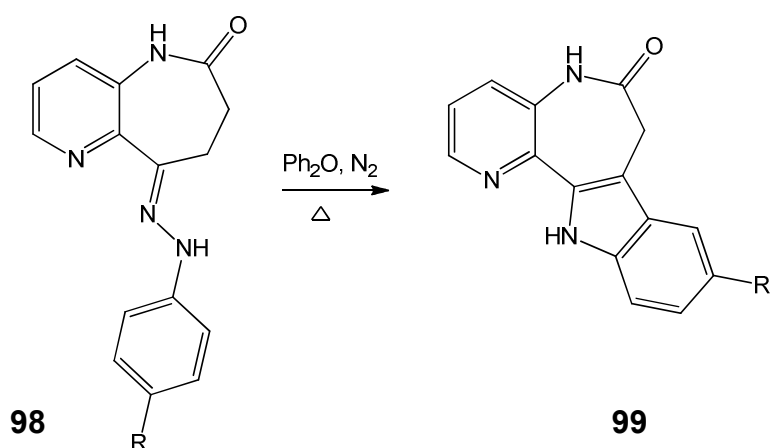
Im Gegensatz zu der bei Berger¹⁰⁰ beschriebenen Methode wurden die neuen Hydrazone **97a-g** zur spektroskopischen Charakterisierung isoliert. Bei der Aufarbeitung der Verbindungen **97** erwies es sich als vorteilhaft, den Niederschlag mit viel Wasser zu waschen, um vorhandene anorganische Verunreinigungen zu beseitigen. Der Reinigungsschritt mittels Umkristallisation entfiel, da eventuell vorhandene Nebenprodukte die anschließende Indolisierung nicht störten. Eine HPLC-Reinheit von 80-90% wurde als ausreichend für die Weiterverarbeitung der Zwischenstufe hingenommen. Die Ausbeute der 4-(2-Hydrazinyl)isoindolin-1,3-dione (**97a-g**) lag zwischen 45-70%.

Anschließend wurden die synthetisierten Hydrazinoisoindole **97** mit wenigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt und für einige Stunden in Eisessig bei 70-80 °C gerührt (Schema 3-22).



Schema 3-22: Versuch der Indoldarstellung **36** mit Schwefelsäure als Katalysator¹⁰⁰
 Substituenten R¹ und R²: siehe Schema 3-21

Mittels säurekatalysierter Fischer-Indol-Synthese^{100, 129} mit konzentrierter Schwefelsäure konnten die Pyrrolo[3,4-*g*]indoldione **36a-f** nicht erschlossen werden. Offensichtlich reicht die Reaktivität der Phenylhydrazone nicht aus, um unter den beschriebenen Standardbedingungen Indole zu bilden. Neben der Säurekatalyse ist auch eine thermisch induzierte Indolisierung ohne die Anwendung von Katalysatoren literaturbekannt.^{130, 131} Durch Erhitzen in siedendem Diphenylether konnte von Stukenbrock¹³¹ das Hydrazon **98** zum entsprechenden Azakenpaullon **99** umgesetzt werden (Schema 3-23).



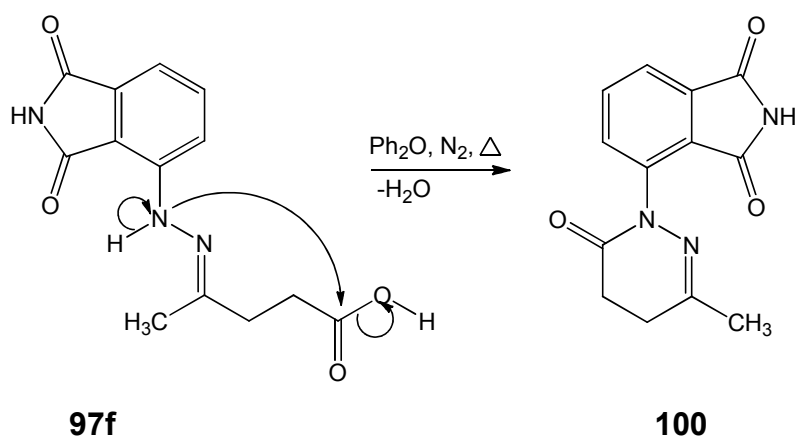
Schema 3-23: Umsetzung des Hydrazon **98** zum Azakenpaullon **99**¹³¹

In Anlehnung daran wurde die Indolisierung der Hydrazone **97a-g** in siedendem Diphenylether unter Stickstoffbegasung für mehrere Stunden durchgeführt. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz auf *n*-Hexan gegeben und der ausgefallene

Niederschlag mit viel Petrolether gewaschen, um am Produkt haftenden Diphenylether herauszulösen. Allerdings konnte trotz langer Reaktionszeiten keine quantitative Umsetzung der Edukte erreicht werden, vielmehr wurden Gemische aus Edukt und Produkt isoliert. Neben der unvollständigen Umsetzung hatten die hohen Temperaturen ($>250\text{ }^{\circ}\text{C}$) während der thermischen Fischer-Indol-Synthese^{130, 131} den Nachteil, dass sich viele Nebenprodukte bildeten.

3.4.3 Darstellung der Verbindung 36f

Beim Erhitzen von 4-(2-(1,3-Dioxoisindolin-4-yl)hydrazonyl)pentansäure (**97f**) in Diphenylether wurde nicht das gewünschte Indol **36f** erhalten, sondern das Pyridazinon **100** (Schema 3-24). Da über einen längeren Zeitraum hohe Temperaturen ($>250\text{ }^{\circ}\text{C}$) angewendet werden, kommt es zur Bildung eines Acylhydrazons zwischen dem sekundären Stickstoff des Hydrazons und der Carbonsäurefunktion.



Schema 3-24: Möglicher Reaktionsmechanismus bei der Bildung von **100**

Das ^1H -NMR-Spektrum des Pyridazinons **100** in $\text{DMSO-}d_6$ zeigte zwei Dubletts von Dubletts und ein Dublett vom Triplet mit der Intensität von jeweils einem Proton im aromatischen Bereich. Es wurden, wie für **36f** zu erwarten gewesen wäre, keine Singulets im tiefen Feld für das Proton der Säuregruppe und das Indolproton erhalten. Das Singulett bei einer Verschiebung von 11.34 ppm mit einer Intensität von einem Proton konnte dem Imidproton zugeordnet werden. Im hohen Feld wurden Signalgruppen eines AA'BB'-Systems mit der Intensität von jeweils zwei Protonen bei einer Verschiebung von 2.57 und 2.65 ppm und ein Singulett mit der Intensität von drei Protonen bei einer Verschiebung von 2.04 ppm erhalten. Diese Signale weisen

auf aliphatische Strukturmerkmale hin (Abb.: 3-20). Im ^{13}C -NMR konnten unter Zuhilfenahme des ^{13}C -DEPT-Spektrums 7 quartäre, 3 tertiäre, 2 sekundäre und 1 primäres Kohlenstoffatom detektiert werden (Abb.: 3-21 und Abb.: 3-22). Bei einer erfolgten Indolisierung wären 9 quartäre Kohlenstoffatome zu erwarten gewesen.

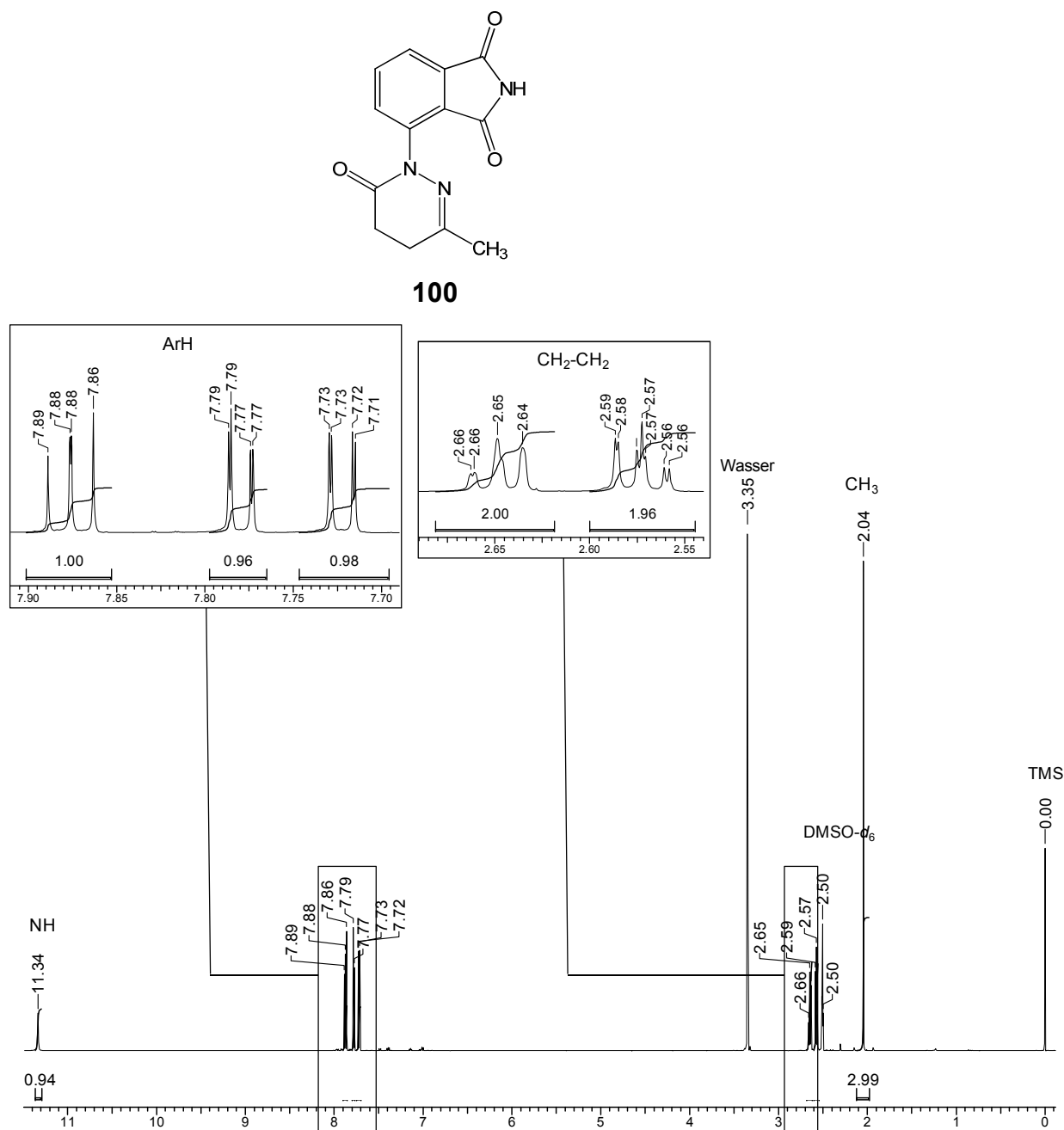


Abbildung 3-20: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Verbindung **100**

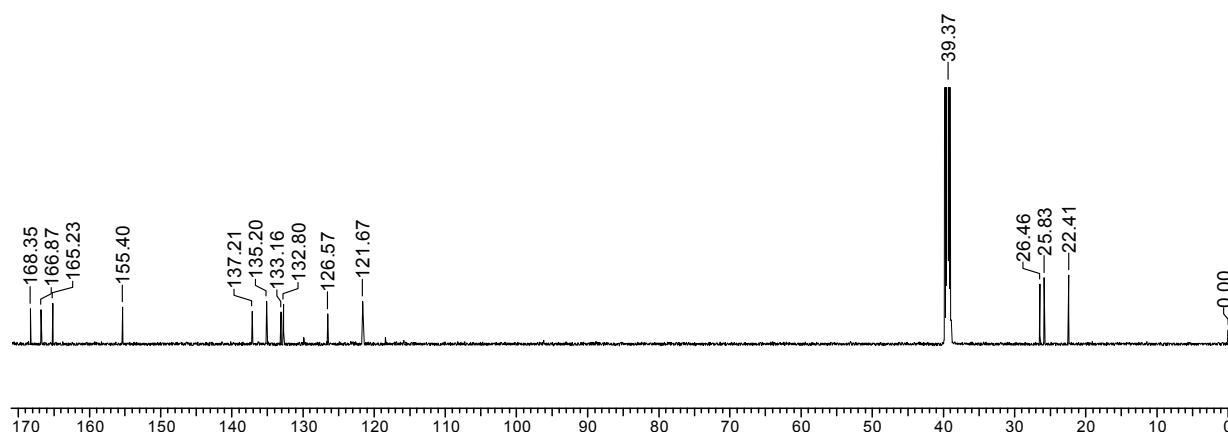


Abbildung 3-21: ^{13}C -NMR von Verbindung **100** (0-170 ppm)

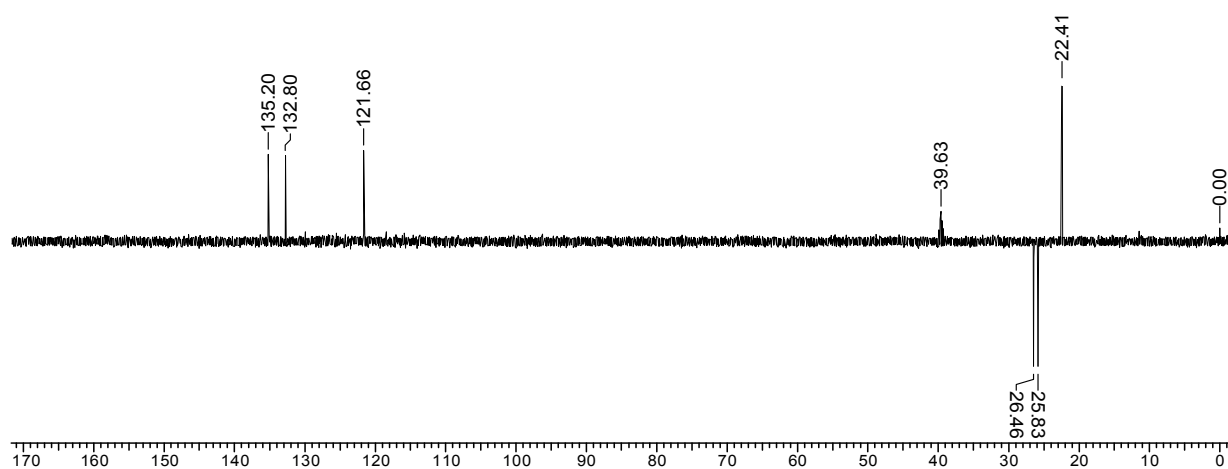


Abbildung 3-22: ^{13}C -DEPT-NMR von Verbindung **100** (0-170 ppm)

Zusätzlich zur eindimensionalen Aufnahmetechnik wurde die Strukturaufklärung mit Hilfe eines H,H-COSYs durchgeführt. Bei dieser zweidimensionalen NMR-Technik wurde die H,H-Korrelationen mittels homonuklearer ^1H -Shift-Korrelation sämtlicher $^1\text{H}, ^1\text{H-Kopplungen}$ eines Moleküls verwendet (H,H-COSY , Abb.: 3-23). Die genaue Zuordnung der Protonen im Molekül lässt sich mit Hilfe des H,H-COSY ermitteln, wobei die Protonen, die miteinander koppeln, einen Kreuzpeak geben.^{114, 115} Im H,H-COSY lässt sich eine deutliche Korrelation der beiden CH_2 -Gruppen für das Molekül **100** erkennen, die bei einer erfolgten Indolisierung nicht enthalten gewesen wäre. Die Kopplung der beiden CH_2 -Gruppen wurde in der Abbildung 3-23 vergrößert dargestellt.

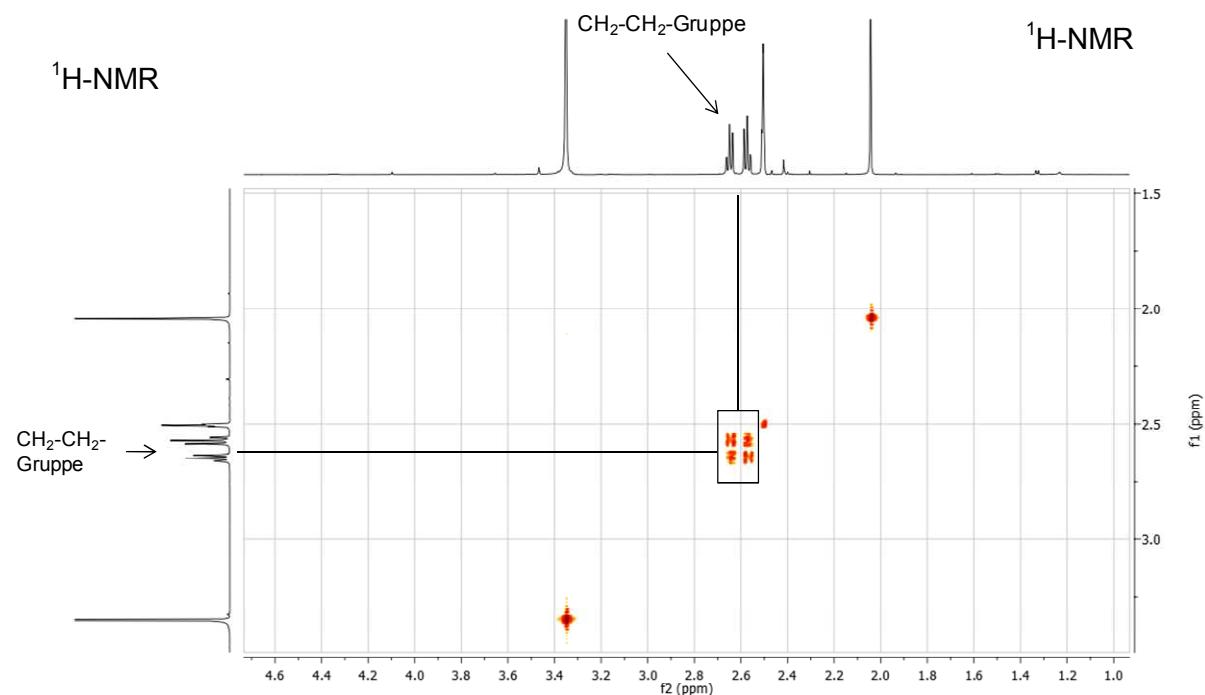
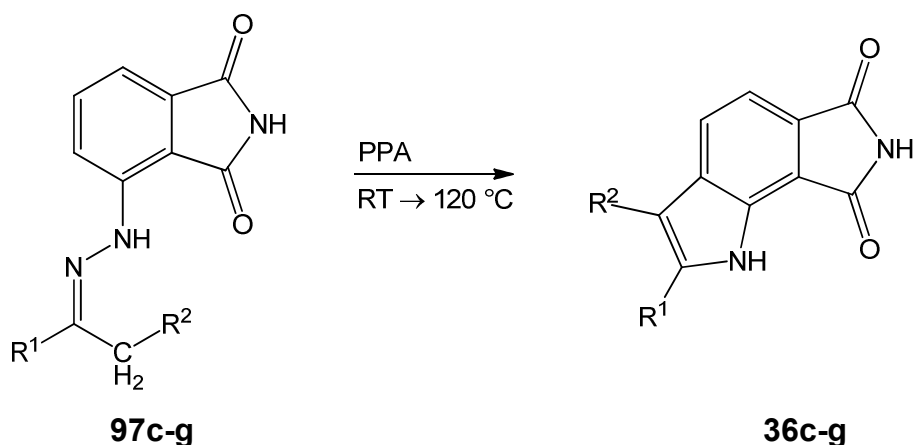


Abbildung 3-23: H,H-COSY-Ausschnitt von Verbindung **100**

Ein Vergleich der gemessenen NMR-Signale mit Voraussagen durch ChemBioDraw (ChemBioDraw Ultra 12.0, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, 2010) bestätigte den Strukturvorschlag für die tatsächlich isolierte Verbindung **100**. Anhand der erhaltenen spektroskopischen Daten kann es sich bei der isolierten Verbindung **100** nicht um das eigentlich angestrebte Indol **36f** handeln. Zum Einen findet sich im ^1H -NMR nur ein Signal für ein austauschbares Proton und zum Anderen deckt sich die Anzahl der einzelnen Kohlenstofftypen nicht mit den bei **36f** zu erwartenden. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass sich bei der Reaktion das Pyridazinon **100** gebildet hat.

Für die Darstellung der Pyrrolo[3,4-*g*]indoldione **36** durch säurekatalytische Fischer-Indol-Synthese wurde schließlich auf eine von Slätt et al.¹³² beschriebene Methode zurückgegriffen. Ziel war es, durch Änderung des Säurekatalysators die Reaktionszeiten zu verkürzen sowie die Ausbeuten im Vergleich zur thermischen Variante zu verbessern. Die Hydrazone **97** wurden hierzu unter Rühren in Polyphosphorsäure (PPA) langsam auf 120 °C erwärmt (Schema 3-25). Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz zu 100 mL einer Eis-/Wassermischung gegeben und mit 2 M Natriumhydroxid-Lösung unter ständiger pH-Kontrolle neutralisiert. Der erhaltene Niederschlag wurde abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen.



Schema 3-25: Indol-Synthese in Polyphosphorsäure¹³²

Substituenten R¹ und R²: siehe Schema 3-21

Nachteilig bei der Verwendung von PPA ist die zähe Konsistenz des Reagenzes, die vor allem Schwierigkeiten bei der Versuchsvorbereitung verursachte. So musste zu Beginn der Reaktion auf eine gleichmäßige Durchmischung des Reaktionsansatzes geachtet werden, da PPA erst ab einer Temperatur von ca. 60 °C flüssig wird.

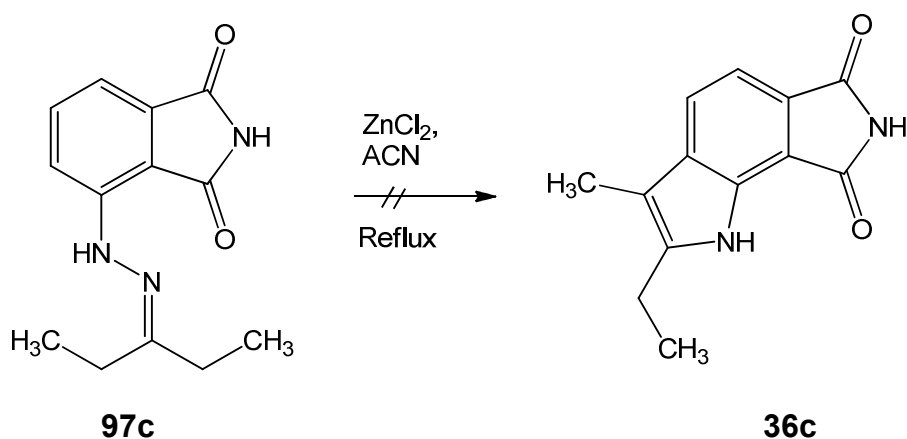
Allerdings konnten nicht alle Hydrazone **97** mit dieser Methode zum Indol umgesetzt werden. So blieb der Ringschluss der Hydrazone **97a** und **97b** in PPA aus. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich in Nachbarschaft der Hydrazonstruktur nur eine Methylgruppe befindet. Dadurch verschiebt sich das Hydrazon-Enhydrazin-Gleichgewicht weg von der Enhydrazin-Form, welche für die Indolisierung notwendig ist (Schema 3-19, s.S. 69).^{128, 133, 134} Die zur Indol-Synthese befähigten Hydrazone **97c-e** und **97g** weisen hingegen eine Ethylgruppe auf, wodurch die Ringbildung leichter aus der tautomeren Form erfolgen kann. Ein literaturbekanntes Beispiel für das Ausbleiben einer Indolisierung bei fehlender Substitution der Methylengruppe ist die Synthese des unsubstituierten Indols, das sich aus den Edukten Acetaldehyd und Phenylhydrazin nicht darstellen lässt.¹³⁵

Nach Eaton et al.¹³⁶ soll ein Gemisch aus Methansulfonsäure und Phosphorpentoxid auf Grund seiner flüssigen Konsistenz gegenüber PPA bei gleichwertiger Katalyseaktivität einige Vorteile in der Handhabung besitzen. Das Methansulfonsäure/Phosphorpentoxid-Reagenz konnte durch Zugabe von Phosphorpentoxid zu Methansulfonsäure unter Lichtschutz und Feuchtigkeitsausschluss hergestellt werden. Nach

mehrstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz filtriert, um eventuell noch vorhandenen Feststoff abzutrennen.

Anschließend wurde das Hydrazon in dem Methansulfonsäure/Phosphorpentoxid-Reagenz bei Raumtemperatur gerührt oder langsam auf 60 °C erwärmt. Die Methode wurde am Beispiel des Hydrazons **97e** erprobt, wobei jedoch kein reines Produkt isoliert werden konnte. Die aufwendigere Herstellung des Säurekatalysators, die langen Reaktionszeiten (>20 h) und die schwierigere Aufarbeitung zeigten keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der Verwendung von PPA als Reaktionsmedium und Katalysator.

Neben den aufgeführten Methoden wurde die Indolisierung auch mit Zinkchlorid in Acetonitril¹³⁷ versucht. Dazu wurde das Hydrazon **97c** mit wasserfreiem Zinkchlorid in getrocknetem Acetonitril zum Reflux erhitzt. Das verwendete Acetonitril muss für die Reaktion möglichst wasserfrei sein, da ein zu hoher Wasseranteil die katalytische Wirkung des Zinkchlorids abschwächen würde. Daher wurde vor Reaktionsbeginn das Acetonitril durch azeotrope Destillation getrocknet. Anschließend wurde das Restwasser nach Karl-Fischer bestimmt, der Gehalt lag bei 0.0046%. Nach Reaktionsende wurde der Reaktionsansatz zu einer Eis-/Wassermischung gegeben, um das Produkt auszufällen. Mit dieser Methode ließ sich keine Indolisierung herbeiführen (Schema 3-26).



Schema 3-26: Versuch einer Indolsynthese von **97c** mit geschmolzenem Zinkchlorid¹³⁷

Die Versuche zur Indolsynthese nach Fischer ausgehend von den Hydrazonen **97** können folgendermaßen zusammengefasst werden: Die konventionelle Indolisierung mit Essigsäure/Schwefelsäure¹²⁸ war ebenso erfolglos wie die Verwendung von Zinkchlorid in Acetonitril.¹³⁷ Mit der thermischen Indolisierung in Diphenylether ließen sich zwar Indole erhalten.^{130, 131} Auf Grund der unbefriedigenden Produktreinheit und der erforderlichen langen Reaktionszeiten war diese Methode dem schließlich ausgewählten Verfahren, der säurekatalysierten Indolisierung in PPA, unterlegen.^{100, 132} Eine Variante, bei der PPA durch ein Methansulfonsäure/Phosphor(V)pentoxid-Reagenz¹³⁶ ersetzt wurde, erwies sich ebenfalls als unvorteilhaft.

3.4.4 Synthese der Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **37**

Neben den Pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dionen **36** sollten auch 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **37** als Mini-Indirubine dargestellt werden. Letztere wurden aus 7-Aminoisindolin-1-on (**101**) (Abb.: 3-24) und verschieden substituierten Carbonyl-Derivaten **96** synthetisiert.

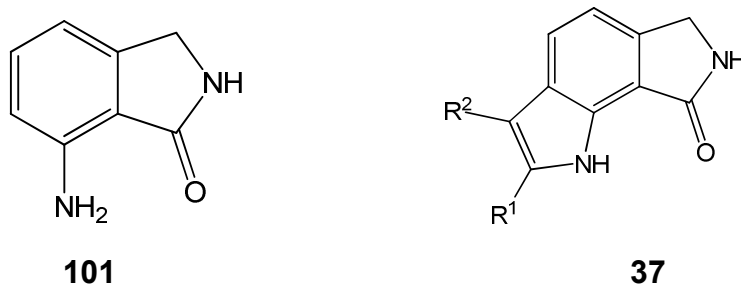


Abbildung 3-24: 7-Aminoisindolin-1-on (**101**) und Mini-Indirubine **37**

Dazu erfolgte die Darstellung des Hydrazins **102** analog zur Synthese des 2-(1,3-Dioxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid **81** (Schema 3-18). Als Ergebnis dieser Methode wurde ein Feststoff isoliert, dessen Masse mehr als der berechneten theoretischen Ausbeute entsprach. Es ist anzunehmen, dass dieser Feststoff Zinn-Doppelsalze des Typs **103** enthielt, wie von Enders¹²⁷ in ähnlichen Fällen beschrieben wurde (Abb.: 3-25). Versuche, dieses Material durch Freisetzen der Arylhydrazin-Base zu reinigen, schlugen fehl. Für weitere Synthesen wurde daher das Zinn-haltige Rohprodukt des Arylhydrazins **102** eingesetzt.

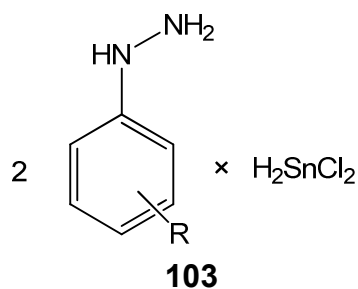
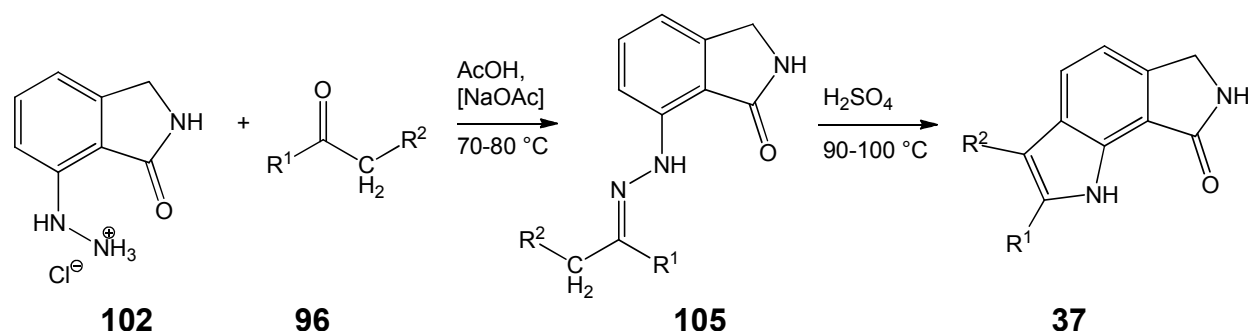


Abbildung 3-25: Zinn-Doppelsalz eines Arylhydrazins

Im Gegensatz zu den Pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dionen **36** lassen sich die 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **37** durch die konventionelle säurekatalysierte Fischer-Indol-Synthese darstellen. Dazu wurde in einer Eintopfreaktion das Hydrazinhydrochlorid **102** mit dem entsprechenden Keton **96** unter Zusatz von Natriumacetat in Eisessig bei 70-80 °C zum Hydrazon **105** umgesetzt. Nach 4-7 h wurde der Ansatz mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt und bei 90-100 °C für weitere 3-13 h gerührt (Schema 3-27).^{100, 129}

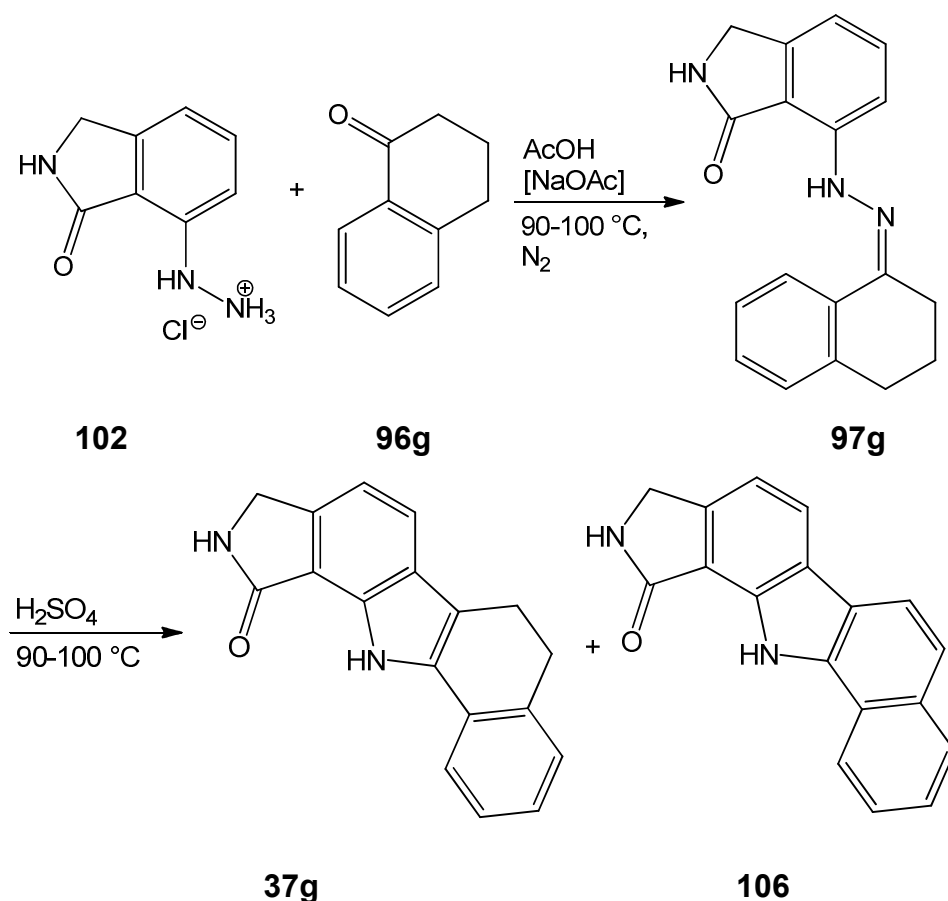


	R ¹	R ²		R ¹	R ²
c	C ₂ H ₅	CH ₃	i		CH ₃
d	CH ₃	CH ₃	j		CH ₃
e	C ₆ H ₅	CH ₃	k		CH ₃
g			l		CH ₃
h	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅			

Schema 3-27: Säurekatalysierte Fischer-Indol-Synthese mit konz. Schwefelsäure

3.4.5 Darstellung der Verbindung 37g

Die Darstellung der Verbindung **37g** aus den Edukten 2-(3-Oxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)hydrazin-Hydrochlorid (**102**) und α -Tetralon (**96g**) wurde auch nach der konventionellen Fischer-Indol-Synthese durchgeführt. Allerdings erfolgte die Synthese unter Stickstoffatmosphäre durchgängig bei einer Temperatur von 90-100 °C. Bei der Reaktion entsteht ein Gemisch aus 37.4% der Theorie **37g** und 2% der Theorie des oxidierten Produkts **106** (Schema 3-28). Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnte das Produkt-Verhältnis bestimmt werden. Auf Grund ähnlicher Polaritäten von **37g** und **106** konnten die Verbindungen weder durch fraktionierende Kristallisation noch durch chromatographische Methoden getrennt werden. Es wird angenommen, dass **106** aus **37g** durch oxidative Dehydrierung zum aromatischen Benzo[*a*]carbazolsystem entsteht. Da dies auch in Abwesenheit von Luftsauerstoff beobachtet wird, könnte auch eine Disproportionierung von **37g** zu **106** führen.



Schema 3-28: Umsetzung von Arylhydrazin **102** mit α -Tetralon (**96g**)

3.4.6 Vergleich der Indolsysteme

Beim Vergleich der Indol-Synthesen mit den Edukten **77** und **101** fällt auf, dass die letztgenannte Verbindung deutlich reaktiver erschien, was sich in schnelleren Umsetzungen und besseren Ausbeuten manifestierte.

Die unterschiedliche Reaktivität der Edukte **77** und **101** ist auf Substituenteneffekte zurückzuführen. Dabei begünstigen Substituenten am Aromaten mit +M-Effekt und/oder +I-Effekt die Indolisierung.^{128, 135}

Das 4-Aminoisoindolin-1,3-dion (**77**) besitzt mit seiner zyklischen Imidstruktur einen ausgeprägten elektronenziehenden Effekt. Dabei verringern die Carbonylgruppen mit ihrem -M- und -I-Effekt die Elektronendichte im Benzenring und beeinflussen negativ die Indolisierung. Aus diesem Grund wird der Einsatz von stärkeren Säurekatalysatoren als konzentrierte Schwefelsäure notwendig. Demgegenüber ist der elektronenziehende Effekt der Lactam-Struktur im Molekül **101** schwächer ausgeprägt und wirkt sich dadurch positiv auf die Indolbildung aus.

Zum direkten Vergleich wurde die Partialladungen mit dem Programm HyperChem berechnet (Abb.: 3-26). Dabei wurden die Hydrazine **81** und **107** verwendet, die die Ausgangsverbindungen der Fischer-Indol-Synthese darstellen. Die Berechnungen zeigen, dass die Elektronendichte in den Positionen 5 und 7 bei **81** deutlich geringer ist als bei **107**.

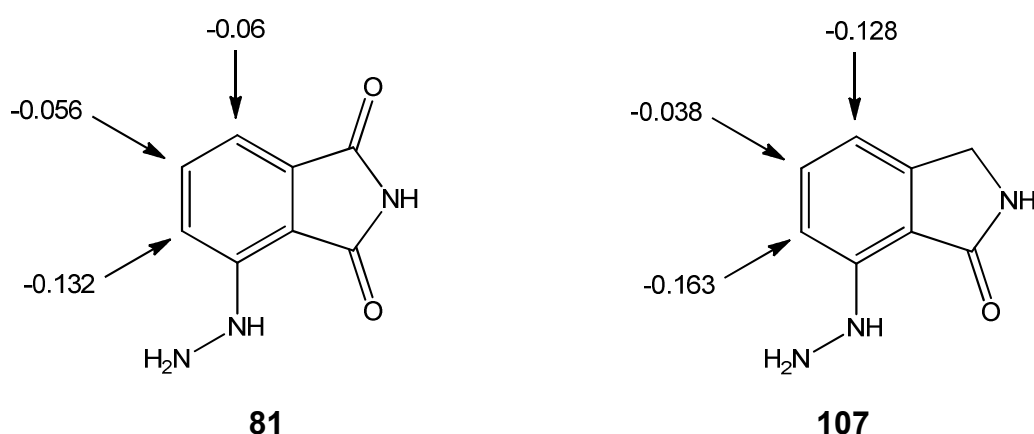


Abbildung 3-26: Partialladungen berechnet mit HyperChem*

*Die Berechnungen wurden von Dr. Lutz Preu, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, durchgeführt.

4 Biologische Aktivität

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre Proteinkinase-inhibitorische Aktivität getestet. Zudem wurden ausgewählte Verbindungen in *in vitro* Zellassays an verschiedenen Tumorzelllinien auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht. Die biologischen Testungen und Daten werden nach Verbindungsklassen geordnet aufgeführt. Für die einzelnen Strukturklassen werden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen diskutiert und mit literaturbekannten Strukturen in Beziehung gesetzt. Durchgeführte Docking-Studien an den Anilinopyrimidinen sollen die abgeleiteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erklären und einen potentiellen Bindungsmodus in der Proteinkinase PLK1 formulieren.

4.1 Anilinopyrimidine

4.1.1 Biologische Testungen der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

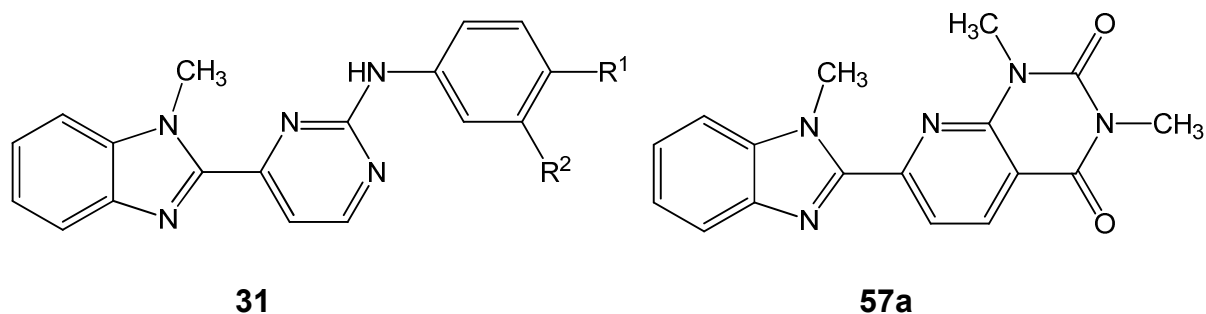
Die Testungen der kinaseinhibitorischen Aktivität wurden von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, durchgeführt. Dabei wurden Vertreter der dargestellten Verbindungsklassen in einem Screening an tumorrelevanten Proteinkinasen und an der Insulin-Rezeptor Kinase (INS-R) untersucht. Eine Hemmung der INS-R soll vermieden werden, da diese zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte. Anschließend wurden IC₅₀-Profile der Testsubstanzen an den Kinasen erstellt. Der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration 50%*) beschreibt die Konzentration einer Verbindung, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Eine Auflistung der IC₅₀-Werte der getesteten Verbindungen sowie eine detaillierte Beschreibung des Assays erfolgt in Kapitel 7.3.1.

Kinaseinhibitorische Aktivität von 31 und 57a

Die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Anilinopyrimidine (**31a-j**) und das strukturverwandte Pyridopyrimidin (**57a**) wurden an 21 tumorrelevanten Kinasen (AKT1, ALK, ARK5, Aurora B, AXL, B-RAF-V600E, CK2- α 1, FAK, IGF1-R, INS-R, MEK1, MET, NEK2, NEK6, PLK1, PIM1, PRK1, SAK, SRC, TRK-B, VEGF-R2) auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Dabei zeigten die Verbindungen **31a-e** unterhalb von 10 μ M keine inhibitorische Aktivität gegenüber den getesteten Kinasen. Die Anilinopyrimidine **31f-j** hemmen spezifisch die Kinasen Aurora B, FAK,

PLK1 und VEGF-R2 im niedrig mikromolaren Bereich. Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht der IC₅₀-Werte [μM] der getesteten Verbindungen wieder.

Tabelle 4-1: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **31a-j** und **57a** an ausgewählten Proteinkinasen^a



	R ¹	R ²	Aurora B	FAK	PLK1	VEGF-R2
31a	H	H	>100	38 ± 23	60 ± 21	13.4 ± 3.7
31b	-CH ₃	H	>100	58	>100	25
31c	Cl	H	>100	69	>100	38
31d	Morpholin-4-yl	H	>100	24	>100	69
31e	-OC ₂ H ₅	H	>100	>100	>100	>100
31f	-OCH ₃	H	62 ± 25	27 ± 10	15 ± 1	44 ± 19
31g	-OH	H	11.1 ± 2.9	11.4 ± 3.6	12 ± 1	9.2 ± 1.9
31h	H	-OH	5.5 ± 0.2	5.2 ± 1.1	3.7 ± 0.4	3.2 ± 0
31i	-OH	Cl	7.0 ± 2.3	10.4 ± 2.7	6.0 ± 0.1	7.5 ± 2.0
31j	-OCH ₃	-OH	6.0 ± 0.2	3.4 ± 0.8	1.2 ± 0.2	7.2 ± 0.3
57a	-	-	>100	92	>100	85

^a Werte mit dargestellter Spannweite repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Testreihen. Werte ohne Spannweite stellen Einzelergebnisse dar.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Ergebnisse in ein Säulendiagramm überführt (Abb.: 4-1). Dazu wurden die pIC₅₀-Werte angegeben, die sich aus dem negativ dekadischen Logarithmus der IC₅₀-Werte ergeben, wobei höhere Säulen eine höhere inhibitorische Aktivität anzeigen. Fehlende Balken stehen für pIC₅₀-Werte ≤4.0. Balken mit dargestellter Spannweite repräsentieren Ergebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen und Werte ohne Spannweite stellen Einzelergebnisse dar.

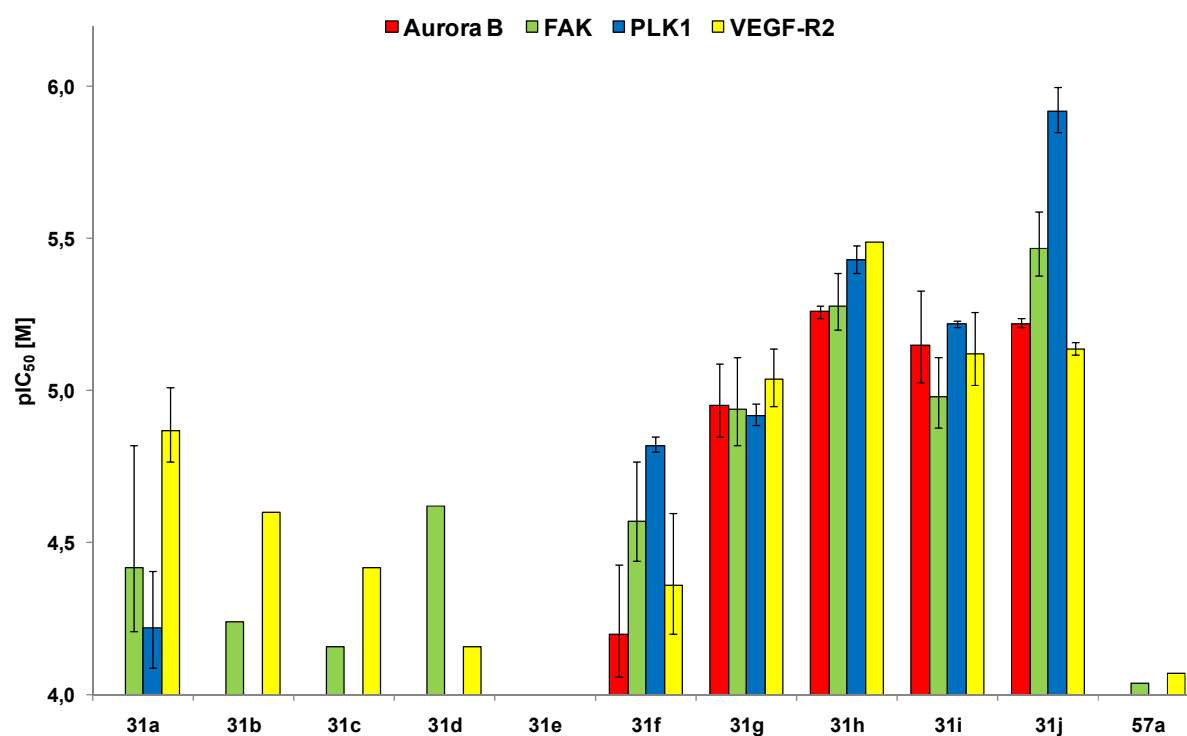


Abbildung 4-1: pIC_{50} [M]-Werte von **31a-j** und **57a** an ausgewählten Proteinkinasen

Die Derivate **31a-e** zeigen gegenüber Aurora B, FAK, PLK1 und VEGF-R2 eine geringe bzw. keine Inhibition. Erst die Einführung einer Methoxygruppe oder einer Hydroxygruppe in 4'-Position **31f** und **31g**, und/oder einer Hydroxygruppe in 3'-Position **31h-j** des Phenylring konnte die biologische Aktivität teilweise um eine Zehnerpotenz verbessern. Die stärkste inhibitorische Wirkung gegenüber den getesteten Kinasen zeigte die Verbindung **31j**. **57a** und **31e** waren am wenigsten aktiv. Die geringe inhibitorische Aktivität von **57a** kann auf das Fehlen eines Akzeptor-Donor-Motivs als Wasserstoffbrücken-bildendes Element zur *hinge*-Region zurückgeführt werden. Egert-Schmidt et al.⁹³ konnten zeigen, dass für die Bindung an die *hinge-region* der 2-Anilinopyrimidin-Teil notwendig ist.

Das Inhibitionsprofil der Anilinopyrimidine **31** ähnelt den von Kohfeld⁹² beschriebenen Kinaseinhibitoren **28**. Dabei zeigten die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]-benzazepin-6-one **28** vor allem eine Hemmung gegenüber den Kinasen VEGF-R2 und -R3, Aurora A und B sowie FAK und PLK1 im niedrig mikromolaren bis nanomolaren Bereich. Ebenso wie **31j** ist das Derivat **28a** ein dualer Inhibitor der VEGF-R2 und PLK1 im niedrig mikromolaren Bereich.⁹²

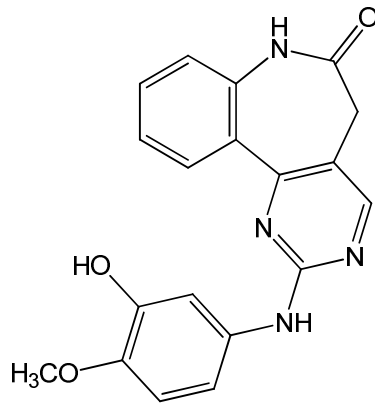


Abbildung 4-2: 2-((3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)amino)-5*H*-benzo[*b*]pyrimido[4,5-*d*]-azepin-6(7*H*)-on (**28a**)

Ausgewählte Proteinkinasen

Im Folgenden wird die Funktion einiger Kinasen erläutert, bei denen im Screening eine Inhibition durch die Testsubstanzen ermittelt werden konnte. Aurora B, FAK, PLK1 und VEGF-R2 erfüllen bei bestimmten Tumorentitäten wichtige Funktionen bei der Tumorentwicklung und -versorgung. Daher könnte eine gezielte Hemmung dieser Kinasen Wachstum und Aggressivität eines Tumors abschwächen.

Aurora-Kinasen

Die Aurora-Kinasen (Aurora A, B und C) gehören zur Gruppe der Serin-/Threoninkinasen und sind in wichtige Prozesse des Zellzyklus involviert. Alle Aurora-Kinasen sind in der Mitose überexprimiert und an mitotischen Strukturen wie der Spindel, den Zentrosomen und den Kinetochoren lokalisiert.¹³⁸

Während Aurora A an der Regulation der Spindel beteiligt ist, kontrolliert Aurora B primär die Kinetochor/Mikrotubuli-Interaktion und die Zytokinese. Aurora B ist während der Prophase an den Chromosomen, während der Prometaphase und Metaphase am Zentromer und während der Anaphase an der mitotischen Spindel lokalisiert. Das Enzym spielt eine zentrale Rolle in der mitotischen Progression und beeinflusst die Chromosomenkondensation und -kohäsion sowie deren korrekte bipolare Anheftung. Zudem ist Aurora B an der Regulation und Kontrolle des Spindelapparates beteiligt (*spindle checkpoint kinase*). Da eine Überexpression von Aurora B in bestimmten Tumorgeweben nachgewiesen werden konnte, wurden in

der Vergangenheit verschiedene niedermolekulare Inhibitoren als Antitumormittel entwickelt.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Der Aurora C werden in der Literatur ähnliche Funktionen wie der Aurora B zugeschrieben.¹³⁸

FAK (*focal adhesion kinase*)

Das Auslösen einer Zell-Matrix-Adhäsion beeinflusst wichtige Zellfunktionen wie die Zellproliferation und -differenzierung, die Regulierung von Genexpression und das Zellüberleben. Die Adhäsion von Zellen wird durch spezifische Strukturen vermittelt, die physiologische Prozesse in Gang setzen, die ihrerseits zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Aktivierung von Signalkaskaden führen können. Die am besten charakterisierte Adhäsion ist die fokale Adhäsion (FA), bei der eine Anlagerung von Integrinen an die extrazelluläre Matrix (ECM) erfolgt. Durch diese Integrin-ECM-Interaktion entstehen Signale, die an intrazelluläre Protein-Tyrosinkinasen wie FAK weitergegeben werden können.¹⁴¹

FAK ist eine zytosolische, ubiquitär exprimierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinase. Das Enzym ist in Zellmigration, -überleben und -adhäsion involviert. Ferner fördert FAK die Tumorangio-genese und die Gewebsinvasion. Ähnlich wie PLK1 interagiert FAK direkt mit dem Suppressorprotein p53.¹⁴² In verschiedenen Tumoren konnte eine erhöhte FAK-Expression nachgewiesen werden, die für das adhäsionsunabhängige Wachstum eines Tumors mitverantwortlich gemacht wird. Besonders eine Überexpression von FAK bei Brustkrebs wird mit schlechter Prognose und Metastasierung in Zusammenhang gebracht.^{143, 144}

PLK1

PLK1 ist ähnlich wie die Aurora-Kinasen in Prozesse der Mitose involviert. In verschiedenen Tumoren konnte eine Überexpression von PLK1 nachgewiesen werden. Obwohl PLK1 für eine normale Zellteilung notwendig ist, wird eine Inhibition als ein vielversprechendes Konzept für die Krebstherapie gesehen.²¹ Nähere Ausführungen zur Rolle der Kinase im Zellzyklus und die Bedeutung für die Antitumorthherapie wurden ausführlich in Kapitel 1.4.2 beschrieben.

VEGF-R2

Auch die VEGF-R2 wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben. VEGF-R2 spielt eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese. Die Multikinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib hemmen VEGF-R2.¹⁶ FAK und VEGF-R2 sind an derselben Signalkaskade beteiligt, daher kann eine gleichzeitige Hemmung signifikant die Tumorangio-genese behindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Inhibition von Aurora B, FAK, PLK1 und VEGF-R2 durch Multikinaseinhibitoren eine vielversprechende Strategie für die Tumorthherapie darstellen könnte.

4.1.2 Biologische Testungen der antiproliferativen Aktivität

Die am stärksten kinaseinhibitorische Verbindung **31j** aus der Serie der Anilino-pyrimidine wurde im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht.¹⁴⁵ Der Zellassay umfasst ca. 60 Tumorzelllinien, die sich in 9 verschiedene Tumorarten gliedern lassen. Dazu gehören nicht kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC), Leukämie, Melanome, Darm-, Brust-, Ovarial-, Nieren- und Prostatakrebs sowie Tumore des zentralen Nervensystems.

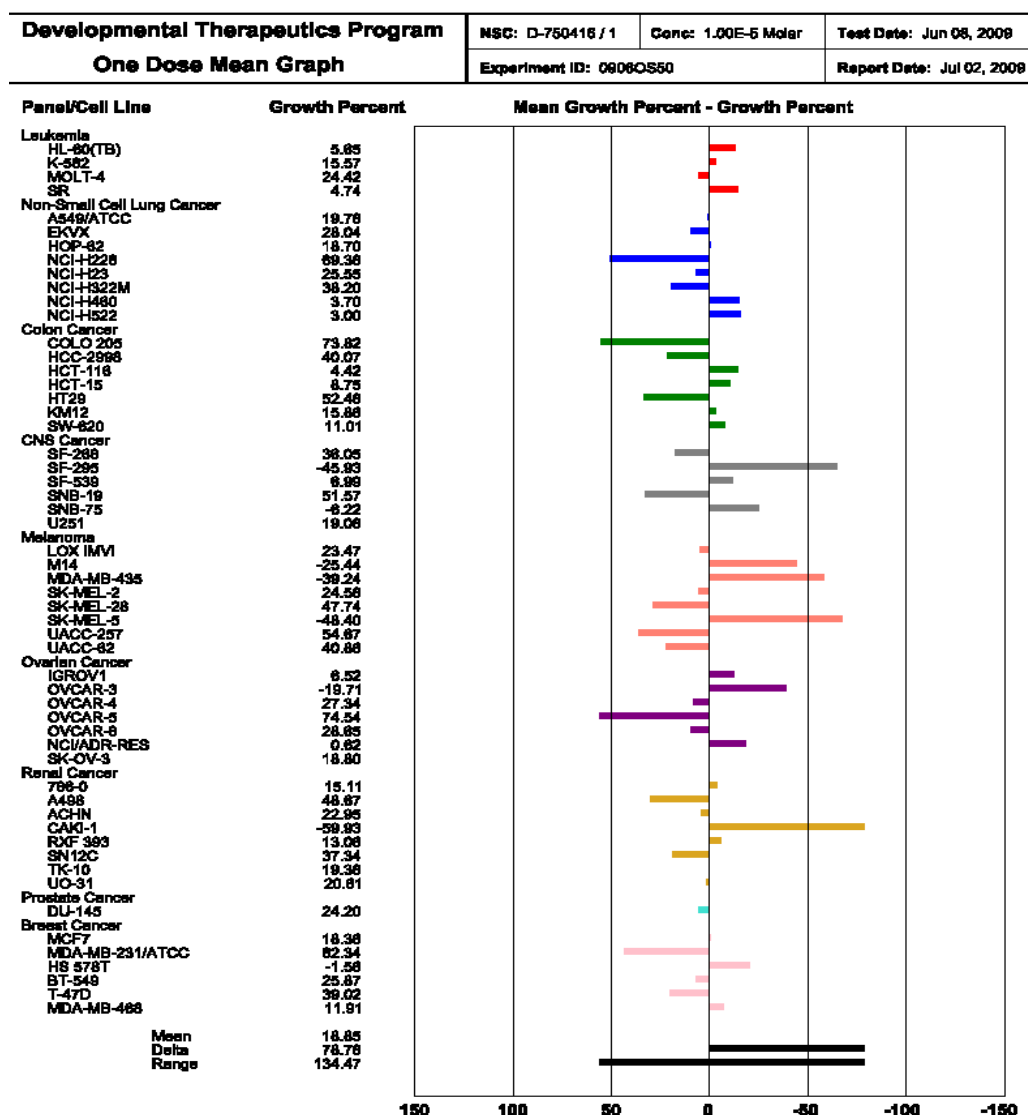
Von der zu testenden Substanz wurde zunächst ein *one dose mean graph* erstellt. Dabei wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 10^{-5} M (*single dose*) das Zellwachstum für jede Zelllinie in Prozent (*growth percent* [%]) sowie das mittlere Zellwachstum aller Tumorzelllinien in Prozent (*mean growth percent* [%]) bestimmt. Da **31j** vielversprechende Ergebnisse zeigte, wurde anschließend bei fünf verschiedenen Konzentrationen (10^{-4} bis 10^{-8} M) an etwa 60 Tumorzelllinien getestet. Dabei lassen sich GI_{50} - (*growth inhibition 50%*), TGI- (*total growth inhibition*) sowie LC_{50} -Werte (*lethal concentration 50%*) berechnen.¹⁴⁶

Eine ausführliche Darstellung der angewandten Methode und der biologischen Daten folgt in Kapitel 7.3.4.

Antiproliferative Aktivität von 31j

Der *one dose mean graph* der Primärtestung von **31j** wird in Abbildung 4-3 angegeben, die das prozentuale Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ausdrückt. Eine Wachstumsinduktion liegt vor, wenn nach Einwirkung der Testsubstanz auf die Zelllinien ein Zellwachstum von über 100% besteht. Liegt das Zellwachstum zwischen 0-100% hemmt die Substanz das Zellwachstum. Entsprechend bedeutet ein Wachstum von unter 0%, dass die Zellen abgetötet wurden. Die zentrale senkrechte Linie in der Graphik entspricht dem mittleren Zellwachstum und wird gleich Null gesetzt. Für jede Zelllinie sind dem Wachstum entsprechend Querbalken angegeben, die das mittlere Zellwachstum abzüglich des Wachstums der individuellen Tumorzelllinie ausdrücken. Befindet sich der Balken auf der rechten (linken) Seite, bedeutet dies ein durchschnittliches Zellwachstum unterhalb (oberhalb) des Mittelwertes, also eine stärkere (schwächere) Inhibition als die durchschnittliche Inhibition der Substanz auf alle Zelllinien zusammengekommen.

Bei Verbindung **31j** lag das mittlere Wachstum der Zelllinien unter 20%. Während verschiedene Krebszelllinien bei Inkubation mit **31j** im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen weniger als 10% proliferierten, konnte ein zytotoxischer Effekt gegenüber einzelnen Zelllinien mit der Abstammung Nierenkrebs, Melanom und ZNS-Tumore festgestellt werden. Nähere Ausführungen zu den erhaltenen Ergebnissen werden im Folgenden beschrieben.

Abbildung 4-3: one dose mean graph von **31j**

Die GI_{50} -Werte der untersuchten Verbindung **31j** werden als Balkendiagramm dargestellt (Abb.: 4-4). Der Mittelwert wird dabei als *meangraph midpoint* (MG-MID) angegeben und beschreibt die durchschnittliche antiproliferative Aktivität der Verbindung gegenüber allen 60 getesteten Tumorzelllinien. Im Balkendiagramm erscheint der *meangraph midpoint* als zentrale senkrechte Achse. Die Zelllinien werden als Balken ausgehend von dieser Achse je nach Inhibitionsgrad nach links oder rechts dargestellt. Ein nach rechts gerichteter Balken zeigt eine überdurchschnittliche Hemmung einer individuellen Zelllinie an. Dementsprechend bedeutet ein nach links gerichteter Balken einen GI_{50} -Wert oberhalb des MG-MID-Wertes. Die Differenz aus \log_{10} MG-MID und $\log_{10} GI_{50}$ entspricht der Länge der Querbalken.

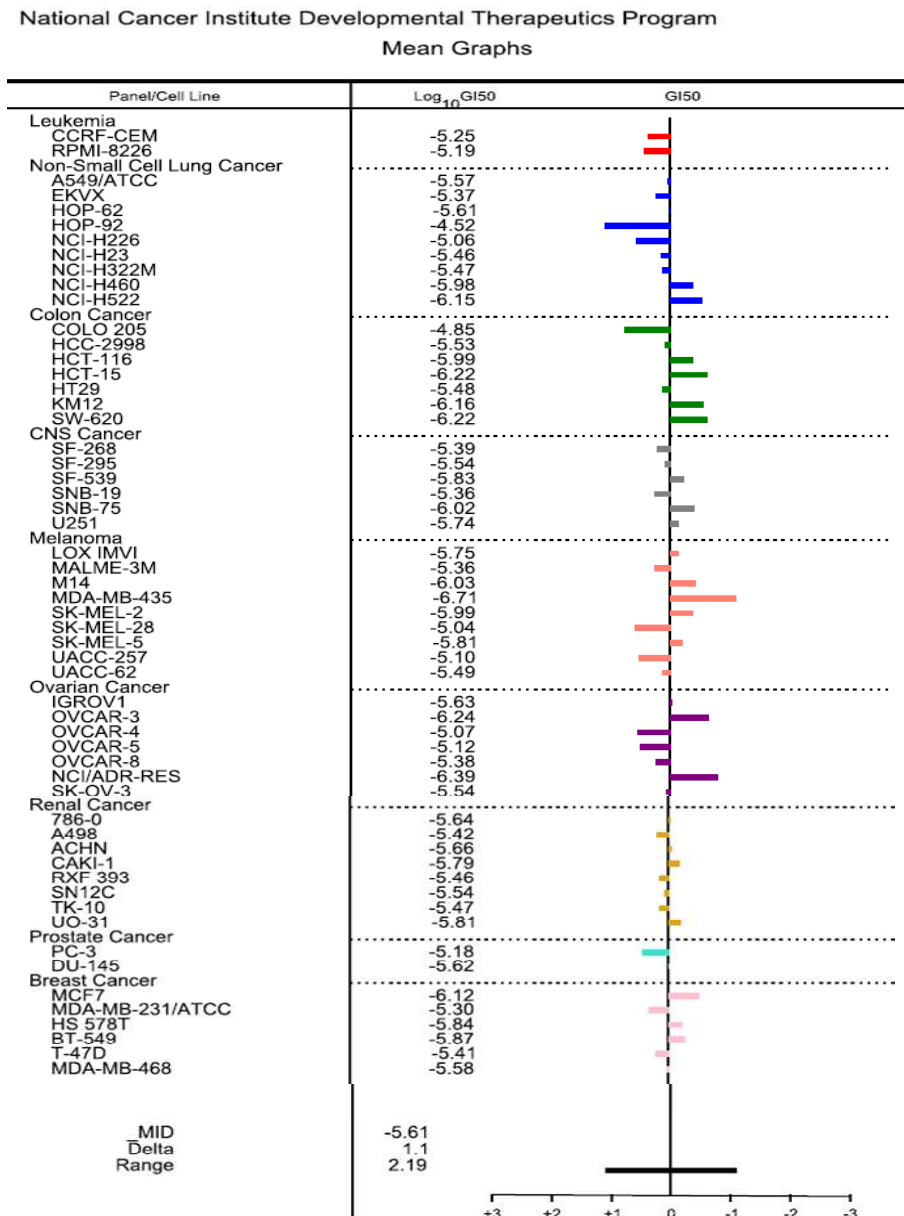


Abbildung 4-4: *mean graph* von **31j**

Entscheidend für die Selektivität einer Verbindung ist das Erscheinungsbild des *mean graphs*. Dieser kann einen ersten Hinweis für einen möglichen Inhibitionsmechanismus geben. **31j** inhibiert nicht nur das Wachstum verschiedener Zelllinien im submikromolaren Bereich, sondern weist auch ein ausgeprägtes Selektivitätsmuster gegenüber spezifischen Krebszelllinien auf. Während die Tumorzelllinien SW-620 (Darmkrebs), MDA-MB-435 (Melanom), OVCAR-3 (Ovarialkrebs), CAKI-1 (Nierenkrebs) und MCF7 (Brustkrebs) besonders empfindlich gegenüber der getesteten Substanz **31j** sind, werden andere Zelllinien (EKVX, HT29, SNB-19, UACC-257, TK-10) nur sehr schwach inhibiert.

Eine Vielzahl fehlregulierter Proteinkinasen sind an der Tumorentstehung der einzelnen Zelllinien beteiligt. Daher wird bei Multikinase-Inhibitoren durch die Hemmung einer bestimmten Auswahl von Proteinkinasen auch eine selektive Zytotoxizität erwartet. Wie Tabelle 4-2 zeigt, ist die mittlere antiproliferative Aktivität von **31j**, Sorafenib und Sunitinib vergleichbar (jeweils 2.4, 2.4 und 2.0 μM). Allerdings erstreckt sich das Inhibitionsprofil von **31j** über 2 Zehnerpotenzen. Die Standardsubstanzen Sorafenib und Sunitinib hingegen inhibieren die meisten Zelllinien im einstelligen mikromolaren Bereich. **31j** und **28a** zeigen im *in vitro* Zelllinien *Screening* des *National Cancer Institute* ein ähnliches Inhibitionsmuster. Diese Korrelation kann auf Grund der strukturellen Verwandtschaft und der ähnlichen kinaseinhibitorischen Aktivität der beiden Verbindungen erwartet werden.

Tabelle 4-2: GI_{50} -Werte [μM] von **28a**, **31j**, Sorafenib und Sunitinib im IVCLSP^a

Zelllinie	28a^a	31j^a	Sorafenib^b	Sunitinib^c
Empfindliche Krebszelllinien				
SW-620 (Darmkrebs)	0.44	0.62	3.2	1.3
MDA-MB-435 (Melanom)	0.20	0.19	2.0	2.0
OVCAR-3 (Ovarialkrebs)	0.55	0.93	3.2	3.2
CAKI-1 (Nierenkrebs)	0.15	0.86	3.2	0.63
MCF7 (Brustkrebs)	0.79	0.47	2.5	2.0
Wenig empfindliche Krebszelllinien				
EKVX (NSCLC)	4.1	17	2.5	7.9
HT29 (Darmkrebs)	3.4	27	2.5	1.6
SNB-19 (ZNS-Krebs)	21	10	3.2	10
UACC-257 (Melanom)	19	5.5	2.0	4.0
TK-10 (Nierenkrebs)	4.1	26	5.0	6.3
mittlere antiproliferative Aktivität				
MG-MID ^d	1.5	2.4	2.4	2.0

^a Ergebnis aus zwei unabhängigen Bestimmungen.

^b Durchschnittswert von drei Testläufen.

^c Durchschnittswert von vier Testläufen.

^d MG-MID = *Meangraph midpoint*, entspricht dem mittleren GI_{50} -Wert [μM] gegenüber allen Zelllinien des *in vitro* Zelllinienassays des NCI.

4.1.3 Matrix Compare Analyse

Mit dem Programm COMPARE kann das Selektivitätsprofil verschiedener Substanzen im IVCLSP miteinander verglichen werden.^{146, 147} Durch paarweisen Vergleich der vom NCI getesteten Substanzen berechnet COMPARE einen Korrelationskoeffizienten (*Pearson correlation coefficient*, PCC). Der PCC kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei ein PCC = 1 bedeutet, dass zwei Verbindungen ein identisches Selektivitätsprofil aufweisen. Bei PCC-Werten >0.6 kann von einem gemeinsamen Wirkmechanismus der verglichenen Testsubstanzen ausgegangen werden.¹⁴⁷ Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Verbindungsklasse strukturelle Untergruppen durch PCC-Werte >0.35 differenziert werden können.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der COMPARE Analyse der getesteten Verbindungen **28a**, **31j**, Sunitinib und Sorafenib^a

	28a	31j	Sunitinib	Sorafenib
28a		0.493	0.437	0.068
31j	0.493		0.41	-0.048
Sunitinib	0.437	0.41		0.188
Sorafenib	0.068	-0.048	0.188	

^a GI₅₀ Werte (Mittelwerte bei mehreren Testläufen; höchste Testkonzentration = 100 µM) der Testsubstanzen. 58-60 Zelllinien wurden verwendet und in die Berechnung des Korrelationskoeffizienten einbezogen.

Die aufgelisteten Ergebnisse in Tabelle 4-3 zeigen eine moderate Korrelation zwischen den Verbindungen **28a** und **31j**. Dies wird anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0.493 deutlich. Interessanterweise zeigt der Multi-kinase-Inhibitor Sunitinib verglichen mit **31j** und **28a** (jeweils PCC = 0.437 und 0.41) ein ähnliches Selektivitätsprofil. Für Sorafenib wurden nur sehr kleine PCC-Werte errechnet, was mit einem deutlich unterschiedlichen Kinase-Inhibitionsprofil bei diesem Wirkstoff zusammenhängen könnte.

4.1.4 Potentieller Bindemodus von **31j** in PLK1

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, scheint ein kleiner sauerstoffhaltiger Substituent in Position 3 oder 4 am Phenylring bei **31** wichtig für eine kinaseinhibitorische Aktivität zu sein. Verbindungen ohne diesen Substituenten (**31a-c**) oder mit einem größeren Substituenten (**31d,e**) erreichen lediglich eine geringe inhibitorische Wirkung. Zur Erklärung der aus der biologischen Testung abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen wurde ein Ligand-Docking durchgeführt.* Zu diesem Zweck wurde die Verbindung **31j** in die ATP-Bindetasche von PLK1 gedockt (Abb.: 4-5, PDB file: 2OWB)¹⁴⁸. Bei dieser Kristallstruktur handelt es sich um ein Kokristallisat mit einem strukturell nicht mit **31** verwandten PLK-Inhibitor.

Nach den Ergebnissen dieser Docking-Studie werden ausgehend vom Anilinopyrimidin-Teil des Moleküls **31j** Wasserstoffbrücken von der Guanidinstruktur an die Aminosäure Cystein 133 der *hinge*-Region ausgebildet. In dieser Pose können zusätzlich vom 3'-Hydroxy-4'-methoxyphenyl-Substituenten Wasserstoffbrücken an das Guanidinmotiv von Arginin 136 ausgebildet werden. Arginin 136 befindet sich am Eingang der Bindetasche, so dass sich der Phenyl-Rest von **31j** in Richtung der *solvent accessible region* orientiert.

Abbildung 4-6 stellt einen Ausschnitt aus der Oberfläche der ATP-Bindetasche dar. Dabei füllt **31j** in der vom Docking-Programm vorhergesagten Orientierung die ATP-Bindetasche gut aus. Da die Aminosäuren Leucin 59 und Arginin 136 durch Überlappung ihrer Oberflächen eine säulenartig geformte Struktur ausbilden, kann es durch zu große Substituenten am Phenylrest des Liganden zu einer sterischen Hinderung kommen. Dies würde sich durch geringere inhibitorische Aktivität bemerkbar machen, wie bei **31d** und **31e** auch tatsächlich beobachtet werden kann.

* Die verwendeten Docking-Programme werden in Kapitel 7.3.5 beschrieben. Die Docking-Studien wurden von Jan Dreher (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie TU Braunschweig) durchgeführt.

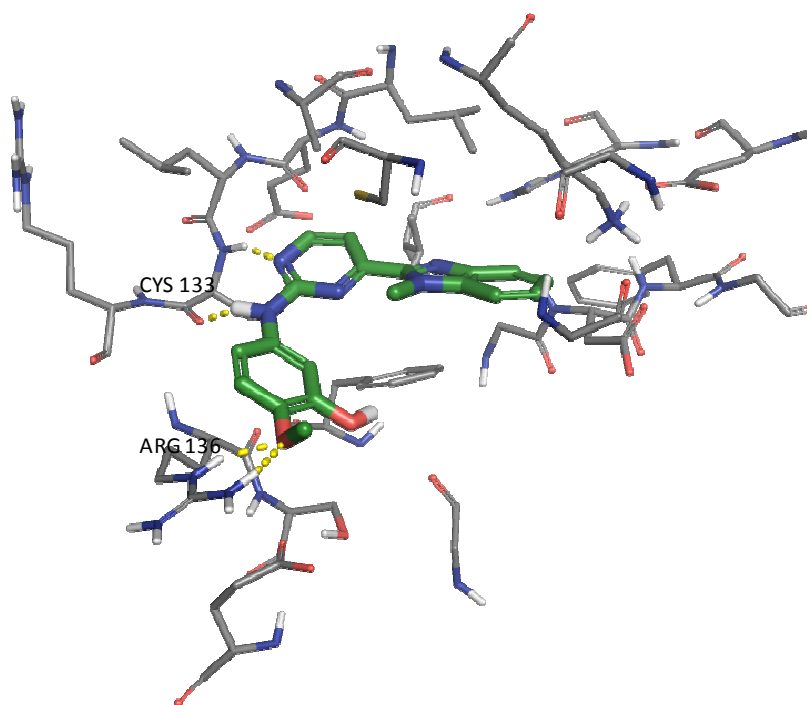


Abbildung 4-5: Möglicher Bindemodus von **31j** in der ATP-Bindetasche von PLK1 (PDB file: 2OWB¹⁴⁸). Darstellung der Wasserstoffbrücken als gelbe gestrichelte Linien.

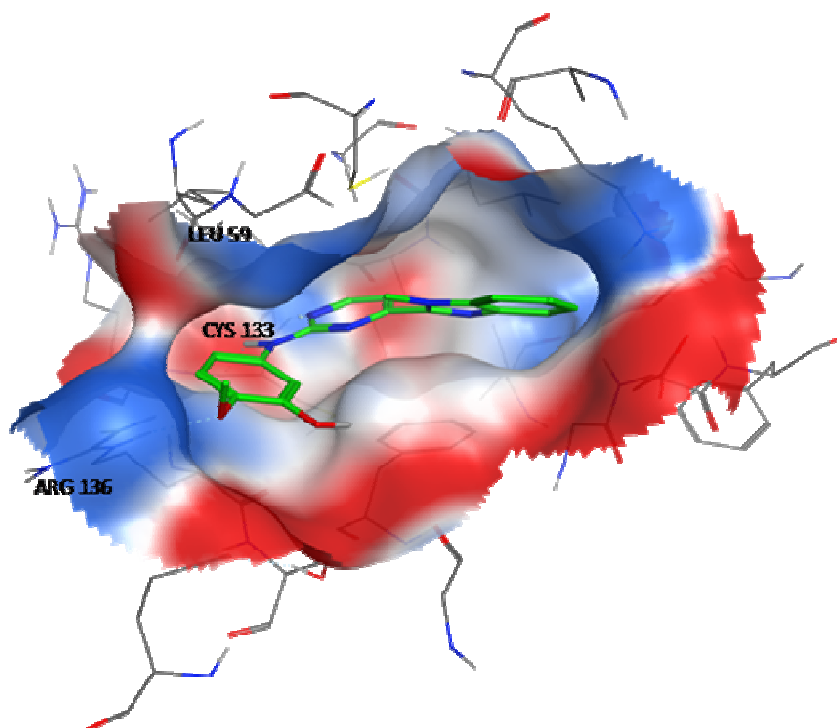


Abbildung 4-6: Oberfläche der ATP-Bindetasche von PLK1 (PDB file: 2OWB¹⁴⁸) mit gedockter Verbindung **31j**.

4.2 Tetrabromisindole

4.2.1 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Tetrabromisindole 67

Einer der zuerst beschriebenen CK2-Inhibitoren war das Benzimidazolderivat 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB).¹⁴⁹ Mit einem IC₅₀-Wert von 13 μ M und einer nur mäßigen Selektivität besitzt dieser Kinaseinhibitor heute nur noch eine geringe Relevanz. Strukturmodifikationen führten zur Bildung von potenteren Verbindungen. Der Austausch der Chloratome gegen vier Bromsubstituenten und der Wegfall des Zuckerrestes konnte die kinaseinhibitorische Aktivität deutlich steigern.¹⁵⁰ 4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol (TBB, **3**) und 4,5,6,7-Tetrabrombenzimidazol (TBI, **108**) stellen solche weiterentwickelten CK2-Inhibitoren dar (Abb.: 4-7). Mit IC₅₀-Werten jeweils um 1 μ M zeigte besonders TBB eine gute Zellpermeabilität und hohe Selektivität gegenüber der Proteinkinase CK2.¹⁵¹ Weitere Strukturvariationen führten zu 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabrom-1*H*-benzimidazol (DMAT, **32**),³² dessen IC₅₀-Wert im Vergleich zu TBB um eine Zehnerpotenz auf 0.14 μ M gesenkt werden konnte.¹⁵² Allerdings weist DMAT eine geringere Selektivität auf, da es auch andere Proteinkinasen wie PIM-1 und DYRK1A mit ähnlicher Aktivität hemmt.³²

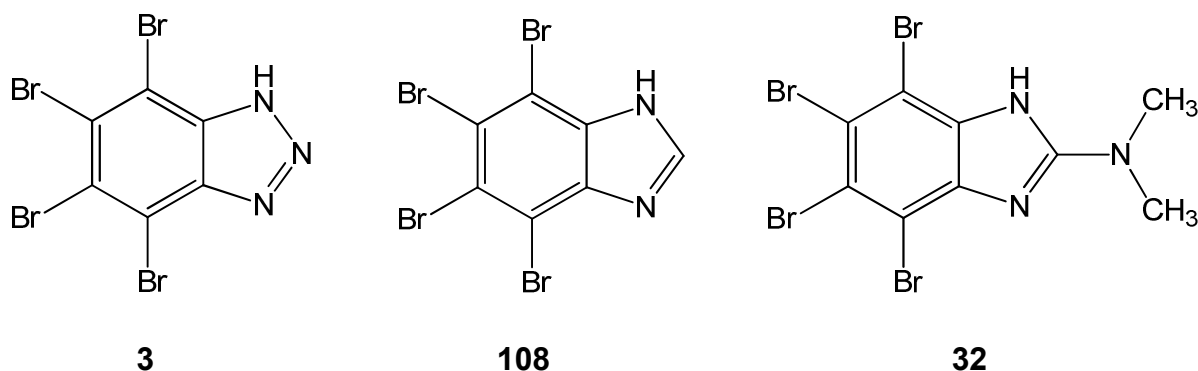
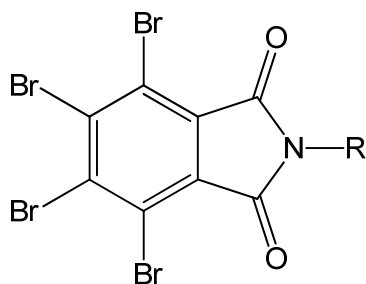


Abbildung 4-7: CK2-Inhibitoren: TBB (**3**), TBI (**108**) und DMAT (**32**)

Golub et al.⁹⁶ beschreiben neue CK2-Inhibitoren mit 4,5,6,7-Tetrabrom-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-dion-Grundstruktur (TID, **33**).

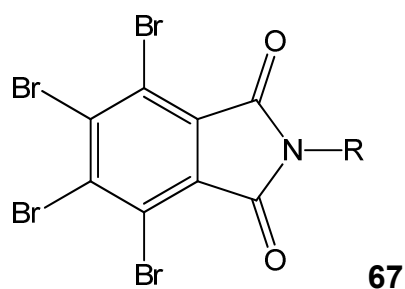


33 R = substituierte aliphatische Säuregruppen

Abbildung 4-8: Struktur der 4,5,6,7-Tetrabromisoindoldione **33** nach Golub⁹⁶

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Tetrabromisoindole **67** stellen eine Weiterentwicklung der beschriebenen Inhibitoren **33** dar. Vertreter der Verbindungs-klasse **67** wurden auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber der Casein Kinase 2 durch die Arbeitsgruppe um L. Pinna (Universität Padua, Italien) untersucht. Dabei wurden von den zu testenden Substanzen IC_{50} -Werte ermittelt, die in Tabelle 4-4 dargestellt sind. Eine detaillierte Beschreibung des Assays findet sich in Kapitel 7.3.2.

Insgesamt zeigen die Verbindungen eine mäßige kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber der Proteinkinase CK2. Mit Ausnahme der Verbindungen **67g** und **67l** besitzen alle Substanzen einen IC_{50} -Wert $>20 \mu M$. Die stärkste inhibitorische Wirkung an der CK2 zeigt Verbindung **67l** mit einem IC_{50} -Wert von $5.5 \mu M$. Der Austausch des Imidazolrestes gegen einen Thiazolrest (**67g**) führte zu einer deutlichen Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität. Auch die Einführung von Thiadiazol- (**67j,i**), Triazol- (**67d**), Pyrazol- (**67c,f**), Isoxazol- (**67k**) oder Pyrazinresten (**67b**) erwies sich als unvorteilhaft.

Tabelle 4-4: IC₅₀-Werte [μM] der Tetrabromisindole **67** an der Proteinkinase CK2

	R	CK2		R	CK2
67b		>40	67i		24.0
67c		23.0	67j		35.0
67d		25.0	67k		>40
67f		>40	67l		5.5
67g		16.0			

4.2.2 Antiproliferative Aktivität der Verbindungen **67g** und **67l**

Die Vertreter mit der stärksten kinaseinhibitorischen Aktivität wurden zusätzlich in einem *in vitro*-Zelllinienassay auf ihre antiproliferative Aktivität gegenüber ca. 60 humanen Tumorzelllinien getestet. Eine ausführliche Beschreibung des *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda MD, USA) sowie die vollständigen Ergebnisse finden sich in Kapitel 7.3.4.

Die Verbindungen **67g** und **67l** wurden auf Grund ihrer vergleichsweise starken kinaseinhibitorischen Aktivität und Stabilität als Vertreter der Verbindungsklasse ausgewählt.

Von jeder Substanz wurde ein Balkendiagramm (*one dose mean graph*) erstellt, das das prozentuale Wachstum jeder Zelllinie nach Inkubation mit der zu testenden Verbindung bei einer Konzentration von 10 μ M sowie das mittlere prozentuale Zellwachstum aller Tumorzelllinien darstellt. Unter Zusatz der Verbindungen **67g** und **67l** wurde in beiden Fällen ein mittleres Zellwachstum aller Zellen von >100% bestimmt. Dementsprechend kann diesen Verbindungen praktisch keine anti-proliferative Wirkung zugeordnet werden. Auf Grund der schlechten Hemmwirkung wurde keine zweite Evaluierung durchgeführt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass mit der Einführung heterozyklischer Ring-systeme in die 4,5,6,7-Tetrabrom-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dion-Grundstruktur keine Steigerung der CK2-inhibitorischen Aktivität erzielt werden konnte. Die am stärksten CK2-inhibitorischen Vertreter **67g** und **67l** zeigten keine signifikante antiproliferative Aktivität im IVCLSP des NCI.

4.3 Mini-Indirubine

4.3.1 Untersuchungen der kinaseinhibitorischen Aktivität

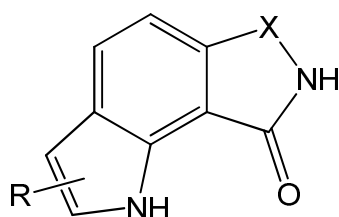
Indirubin und Derivate stellen Enzyminhibitoren dar, die bevorzugt Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) hemmen.⁷⁹ CDKs sind Serin-/Threoninkinasen, die zentral an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind.³⁵ Neben den CDKs wird auch die strukturell eng verwandte Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) inhibiert.⁸³ Die Glycogen Synthase Kinase-3 ist eine Serin-/Threoninkinase, die gewebespezifisch in zwei Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β , auftritt. GSK-3 ist an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt und besitzt insbesondere regulierende Funktionen in der Insulinsignalkaskade und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg.⁴¹ Weiterführende Beschreibungen zu den Kinasen sind dem Kapitel 1.4.2 zu entnehmen.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Mini-Indirubine **37** stellen eine neuartige Verbindungsklasse dar. Vertreter dieser Substanzklasse wurden hinsichtlich ihrer kinaseinhibitorischen Aktivität gegenüber 15 Proteinkinasen von einer Arbeitsgruppe

um L. Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) untersucht. Dazu wurde die prozentuale Restaktivität der verschiedenen Kinasen unter Zusatz von 10 μM der zu untersuchenden Verbindung ermittelt. Als ausgewählte Kinasen wurden verschiedene CDKs (CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, CDK5/p25, CDK9/Cyclin T) und GSK-3 sowie verwandte Kinasen wie CK1, CLK1-4, DYRK1A, 1B, 2 und 3 und Pim1 verwendet. Die Verbindungen **36e** und **101** wurden an den Kinasen CDK5, CK1, GSK-3 und DYRK1A getestet und ihre IC_{50} -Werte bestimmt.

Im Vergleich zu Indirubin und dessen Derivaten zeigen die Mini-Indirubine **36d** und **37** ein geändertes Inhibitionsprofil. Die untersuchten Verbindungen weisen insbesondere bei Mitgliedern der CLK- und DYRK-Familie eine signifikante Hemmwirkung auf. Tabelle 4-5 gibt eine Übersicht der prozentualen Restaktivitäten an diesen Kinasen unter Zusatz der untersuchten Verbindungen wieder. Die übrigen Kinasen des Assays zeigen Restaktivitäten $>50\%$.

Tabelle 4-5: Restaktivitäten [%] von Kinasen der CLK- und DYRK-Familie unter Zusatz von **36d** und **37** [10 μM]^a



36d X: C=O
37 X: CH₂

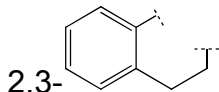
Verbindung	R		Verbindung	R	
36d	2-CH ₃	3-CH ₃	37h	2-Ph	3-C ₂ H ₅
37c	2-C ₂ H ₅	3-CH ₃	37i	2-(4-H ₃ C-Ph)	3-CH ₃
37d	2-CH ₃	3-CH ₃	37j	2-(4-H ₃ CO-Ph)	3-CH ₃
37e	2-Ph	3-CH ₃	37k	2-(4-Cl-Ph)	3-CH ₃
37g			37l	2-(3-F ₃ C-Ph)	3-CH ₃

Tabelle 4-5: Restaktivitäten [%] von Kinasen der CLK- und DYRK-Familie unter Zusatz von **36d** und **37** [10 μ M]^a (Fortsetzung)

	CLK1	CLK2	CLK4	DYRK1A	DYRK1B	DYRK2
36d	52±10	33±7	21±1	41±8	39±5	20±5
37c	20±2	31±4	7±2	54±1	46±8	42±12
37d	92±8	63±17	48±6	82±5	77±11	61±4
37e	29±4	30±1	10±0	58±7	50±5	57±25
37g	42±3	28±19	23±2	64±15	61±9	24±5
37h	66±3	66±5	38±3	74±14	65±8	50±6
37i	105±12	77±6	64±9	99±16	85±7	75±11
37j	124±19	86±5	81±9	101±11	89±16	77±18
37k	110±13	88±6	68±6	98±8	81±9	72±14
37l	119±11	87±8	79±10	105±5	76±11	77±15

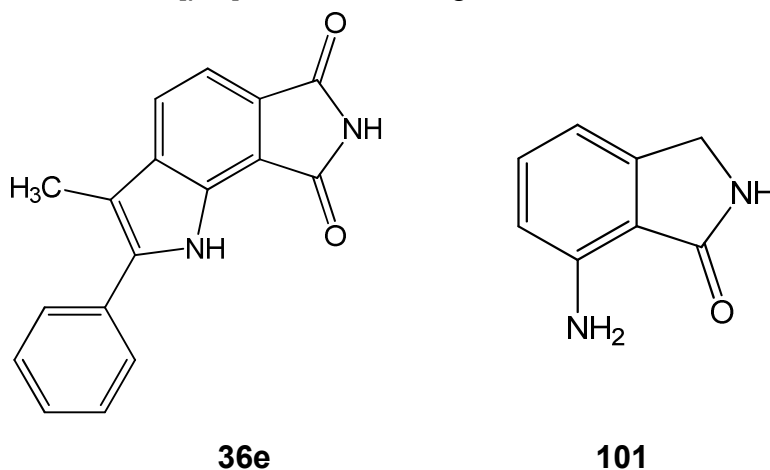
^a Werte mit Standardabweichung repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Testreihen.

Die Verbindungen **37i-l** besitzen in Position 2 jeweils substituierte Phenylreste. Diese Untergruppe der Mini-Indirubine zeigt an den in Tabelle 4-5 aufgeführten Kinasen die schwächsten Inhibitionswerte. Im Vergleich dazu weist die am Phenylring unsubstituierte Verbindung **37e** deutlich stärkere Hemmaktivität an diesen Kinasen auf. Dies spricht für eine räumliche Einschränkung des Bereichs der ATP-Bindetasche, in dem der 2-Phenylrest bindet. Auch im Bereich der 3-Position der Inhibitoren herrscht offenkundig eine Begrenzung des Platzangebotes in der Bindetasche der Kinasen. Wird die 3-Methylgruppe in **37e** durch eine Ethylgruppe ersetzt, zeigt das entsprechende Derivat **37h** an den hier betrachteten Kinasen verminderte Hemmaktivität. Der 2-Phenylrest von **37e** kann dagegen durch einen Ethylrest ohne Aktivitätsverlust ersetzt werden, so dass das entsprechende Analogon **37c** praktisch äquipotent zu **37e** ist. Ein noch kleinerer Rest in 2-Position ist jedoch ungünstig, denn die 2,3-Dimethylverbindung **37d** ist an den CLK-/DYRK-Kinasen schwächer aktiv als das 2-Ethyl-3-methylanalogon **37c**. Der Austausch der CH₂-Gruppe in 6-Position von **37c** gegen eine Carbonylgruppe führt zu dem Analogon **36d**, das bei ähnlicher Hemmaktivität ein leicht verändertes Inhibitionsprofil bei den CLK-/DYRK-Kinasen aufweist.

Tabelle 4-6 gibt die IC₅₀-Werte der Verbindungen **36e** (2'-Ph, 3'-CH₃) und **101** an vier ausgewählten Kinasen wieder. **101** stellt als Aminoisindol die Ausgangsverbindung für die Mini-Indirubin-Reihe **37** dar.

Anhand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass **101** mit IC₅₀-Werten >100 µM keine inhibitorische Aktivität gegenüber den getesteten Kinasen zeigt. **36e** zeigt eine signifikante selektive kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber der GSK-3 im unteren mikromolaren Bereich. Die in Tabelle 4-5 aufgeführten Verbindungen erzielten hingegen für GSK-3 nur eine mäßige Hemmwirkung mit überwiegend Restaktivitäten >50%.

Tabelle 4-6: IC₅₀-Werte [µM] der Verbindungen **36e** und **101**



	36e	101
CDK5/p25	>10	>100
CK1	>10	>100
GSK-3	4.1	>100
DYRK1A	>10	>100

4.3.2 Ausgewählte Proteinkinasen

Die im Rahmen des Kinaseassays ermittelten Proteinkinasen, die durch die synthetisierten Verbindungen besonders gehemmt werden konnten, sollen im Folgenden beschrieben werden.

CLK (*cdc2-like kinase*)

Die Mitglieder der CLK-Familie gehören zur Gruppe der CMGC-Kinasen und phosphorylieren neben Serin-/Threonin- auch Tyrosinreste. Daher werden sie auch als Kinasen mit dualer Spezifität bezeichnet. Es gibt vier verschiedene Isoformen (CLK1-4), von denen CLK1 und CLK4 eine große Strukturhomologie aufweisen. Die Funktion der CLKs ist noch nicht komplett geklärt. Es wird in der Literatur diskutiert, dass CLKs einerseits sogenannte SR-Proteine (Serin- und Arginin-reiche Proteine) phosphorylieren, die in das Spleißen von prä-mRNA eingreifen.¹⁵³ Andererseits wird beschrieben, dass CLKs das „alternative Spleißen“ (*alternative splicing*) regulieren. Eine Vielzahl menschlicher Gene exprimieren basierend auf alternativem Spleißen mehr als nur eine mRNA. Dies führt zu Proteinvariabilität, so dass Fehlregulationen häufig Ursache für Krebs und andere pathologische Zustände sind. CLKs sollen weiterhin an neuronalen Erkrankungen beteiligt sein. Sie regulieren auch das alternative Spleißen von Mikrotubuli-assoziiertem Tau-Protein und spielen eine Rolle in der Entstehung von Demenz und Parkinson.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Das Benzothiazol-Derivat TG003 (**109**) ist der erste literaturbekannte spezifische Inhibitor von CLK1 und CLK4, mit einem IC₅₀-Wert von 20 nM bzw. 15 nM (Abb.: 4-9).^{154, 157}

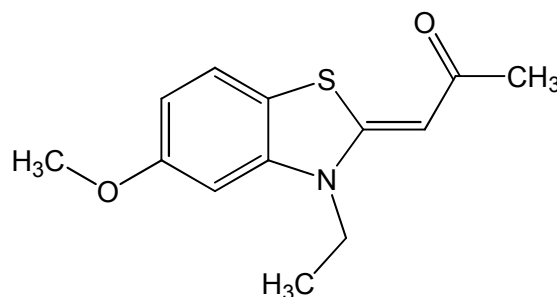


Abbildung 4-9: Struktur von TG003 (**109**)

DYRKs (dual specificity tyrosine regulated kinases)

Die Familie der DYRK-Kinasen lässt sich auf Grund der Sequenzähnlichkeiten innerhalb der katalytischen Domäne zur CMGC-Gruppe zählen.^{2, 40, 158} Im menschlichen Genom konnten fünf Gene dieser Gruppe identifiziert werden. Dabei wurde als erstes Protein dieser Gruppe die DYRK1A entdeckt. Weitere Vertreter der DYRK-Familie sind das DYRK1B (Synonym: Mirk), DYRK2, DYRK3 (Synonym: REDK) und DYRK4.¹⁵⁹

Die Mitglieder der DYRK-Familie besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit innerhalb der Kinasedomäne und einer kurzen N-terminalen Region (*DYRK Homology* (DH) *Box*). Dies ist ein Sequenzmotiv bestehend aus sauren Aminosäuren (DDDNxDY). Allerdings besitzen sie individuelle Unterschiede in den N- und C-terminalen Domänen. Gemeinsamkeiten von DYRK1A und DYRK1B jedoch sind ein Kern-Lokalisierungssignal (NLS) innerhalb der N-terminalen Region und ein PEST-Motiv (Peptid-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)) innerhalb des C-Terminus. Letzteres gilt als Signal für einen schnelleren Abbau in der Zelle. Im Gegensatz dazu enthalten DYRK2, DYRK3 und DYRK4 in ihrer Aminosäuresequenz kein NLS, sondern eine allgemeine NAPA-Domäne (*N-terminal autophosphorylation accessory region*) innerhalb des N-Terminus.¹⁵⁸

DYRK Proteine sind eine Gruppe von Enzymen, die Phosphorylierungsaktivität sowohl an Serin-/Threonin- und Tyrosinresten besitzen. Jedoch konnte für exogene Substrate einzig die Phosphorylierung an Serin-/Threoninresten gezeigt werden. Die Aktivierungsschleife ist charakterisiert durch die Phosphorylierung des YxY-Motivs, das essentiell für die katalytische Aktivität der DYRK Proteine ist.¹⁵⁸ X steht für einen Threoninrest und Y für einen Tyrosinrest. Voraussetzung für die katalytische Aktivität ist die Phosphorylierung des zweiten Tyrosins. Dabei unterscheidet sich der Aktivierungsmechanismus durch Tyrosin-Autophosphorylierung von dem der MAP-Kinasen, die durch übergeordnete Kinasen am Tyrosin- und Threoninrest phosphoryliert werden müssen.¹⁶⁰

DYRKs spielen insbesondere eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Zellteilung und -differenzierung sowie der Neurogenese. Auch die nah verwandten Cdc2-ähnlichen Kinasen (CLKs) sind an Differenzierungs- und Wachstumsprozessen der Zelle beteiligt.¹⁵⁶

DYRK1A findet sich hauptsächlich im Zellkern. Es wird vornehmlich für die mit dem Down-Syndrom assoziierte geistige Retardierung verantwortlich gemacht. Das menschliche DYRK1A-Gen ist in der für das Down-Syndrom kritischen Region auf dem Chromosom 21 lokalisiert. Insgesamt wird DYRK1A eine regulierende Rolle bei der Gehirnentwicklung zugeschrieben. Bei Patienten mit Down-Syndrom konnte im Gehirn eine 1.5-fache Überexpression von DYRK1A ermittelt werden.^{160, 161}

Das DYRK1B-Gen ist auf dem menschlichen Chromosom 19 lokalisiert und wird überwiegend im Hoden und im Skelettmuskel transkribiert. Ähnlich wie DYRK1A befindet sich DYRK1B auf Grund seines N-terminalen Kernlokalisationssignals vornehmlich im Zellkern. DYRK1B weist jedoch andere Funktionen als DYRK1A auf. Die während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus von Myoblasten stark exprimierte DYRK1B stabilisiert den CDK-Inhibitor p27^{Cip1} und destabilisiert Cyclin D1 durch Phosphorylierung, wodurch Wachstumsstopp eintritt bzw. die Differenzierungsphase aufrecht erhalten wird. In Tumorzelllinien besitzt die DYRK1B ebenfalls besondere Funktionen. So vermittelt das Enzym nach Aktivierung durch K-ras/Rac/MKK3 eine antiapoptotische Wirkung. Zahlreiche Tumorzelllinien exprimieren DYRK1B als Überlebensfaktor.^{162, 163}

DYRK2 ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Das Enzym stellt ein Schlüsselenzym in verschiedenen zellulären Prozessen wie der Protein- und der Glycogensynthese, Zellproliferation und -differenzierung dar. Ebenso interagiert DYRK2 mit dem p53 Suppressorprotein. Das Enzym ist in verschiedenen Krebsarten amplifiziert und überexprimiert, beispielsweise in Adenokarzinomen der Speiseröhre und der Lunge.¹⁶⁴

DYRK3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Erythropoiese. Verminderte DYRK3-Expression beeinflusst signifikant und spezifisch die Produktion der Erythrozyten.¹⁵⁹

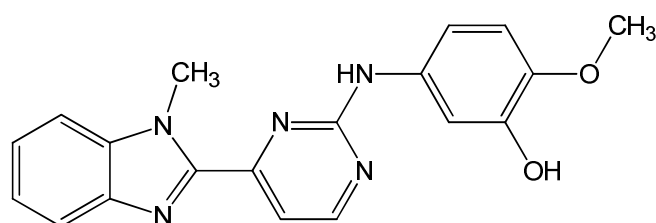
Von DYRK4 liegen vergleichsweise wenige Daten vor. Dem Enzym wird auf Grund des mengenmäßig hohen Vorkommens im Hoden eine wichtige Funktion in der Spermiogenese zugeschrieben.¹⁵⁹

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Synthese und Charakterisierung von drei verschiedenen Klassen von Proteinkinase-Inhibitoren. Dabei handelt es sich um die (5.1) Anilinopyrimidine, (5.2) Tetrabromisindole und (5.3) Mini-Indirubine.

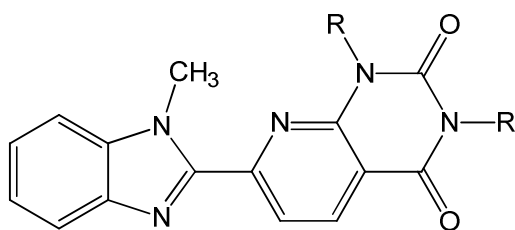
5.1 Anilinopyrimidine

Ausgehend von der Substanzklasse der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one, die als potente Inhibitoren der Kinasen VEGF-R2 und -R3, Aurora A und B, PLK-1 sowie FAK bekannt waren, konnten durch strukturelle Modifizierung neuartige 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine **31** mit ähnlichem Inhibitionsprofil synthetisiert werden. Von insgesamt 21 getesteten tumorrelevanten Proteinkinasen wurden Aurora B, FAK, PLK1 und VEGF-R2 im niedrig mikromolaren Bereich gehemmt. Die 3'-Hydroxy-4'-methoxyphenylsubstituierte Verbindung **31j** erwies sich als der Vertreter mit der stärksten kinaseinhibitorischen Aktivität. Dementsprechend wurde diese vom *National Cancer Institute* auf ihre anti-proliferative Aktivität an ca. 60 Tumorzelllinien untersucht. Der mittlere GI₅₀-Wert von **31j** lag im niedrig mikromolaren Bereich, vergleichbar mit den mittleren GI₅₀-Werten der etablierten Kinaseinhibitoren Sorafenib und Sunitinib.



31j

Die ebenfalls synthetisierten strukturverwandten Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine **57** zeigten nur schwache Kinaseinhibition. Da bei der Synthese dieser Verbindungen die Bildung von verschiedenen Isomeren in Betracht gezogen werden muss, wurde die Struktur von **57** eindeutig mittels zweidimensionaler NMR-Techniken und einer Röntgenstrukturanalyse (**57a**) abgesichert.

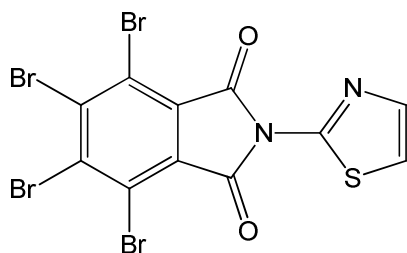


57a: R = CH₃

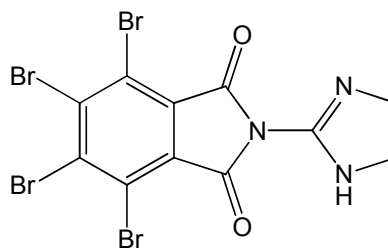
57b: R = H

5.2 Tetrabromisindole

Als potentielle CK2-Inhibitoren wurden die Tetrabromisindole **67** dargestellt. Diese Verbindungen zeigten nur eine schwache Hemmaktivität an der biologischen Zielstruktur. Einzelne Vertreter der Tetrabromisindole wurden zur Bestimmung der antiproliferativen Aktivität beim *National Cancer Institute* an ca. 60 Tumorzelllinien untersucht. Für die getesteten Verbindungen **67g** und **67l** konnte keine signifikante antiproliferative Aktivität beobachtet werden.



67g

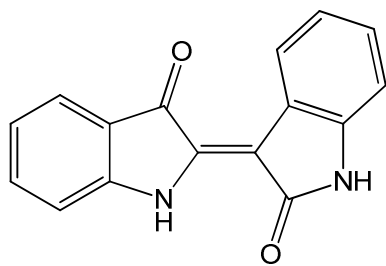


67l

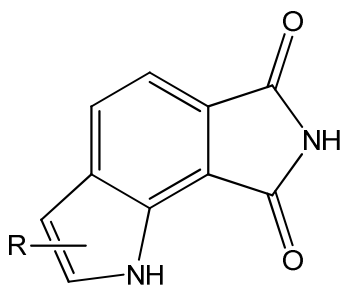
Untersuchungen zur Stabilität ergaben, dass die meisten Vertreter dieser Substanzklasse gelöst in DMSO bei Raumtemperatur für mindestens eine Woche unverändert bleiben.

5.3 Mini-Indirubine

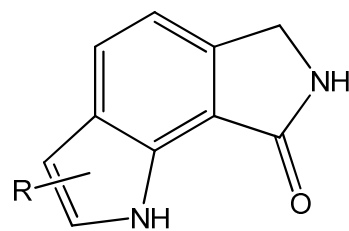
Die neuartige Verbindungsklasse der Mini-Indirubine wurde als dritte Serie potenzieller Proteinkinase-Inhibitoren synthetisiert. Diese Pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dione **36** und Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **37** lehnen sich strukturell an das literaturbekannte Indirubin **21** an.



21



36



37

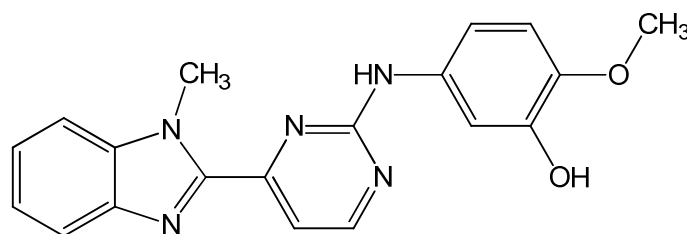
In einem Assay an 15 Proteinkinasen wurde eine signifikante Hemmung von Vertretern der CLK- und DYRK-Familie durch einige der neu synthetisierten Mini-Indirubine **36** und **37** ermittelt.

6 Summary

This thesis reports the syntheses and characterizations of three different classes of protein kinase inhibitors, namely (6.1) anilinopyrimidines, (6.2) tetrabromoisindoles and (6.3) mini-indirubines.

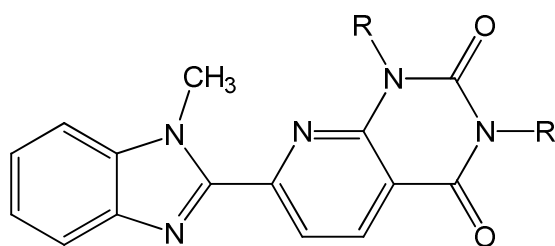
6.1 Anilinopyrimidines

Based on 2-anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-ones, which are known as potent inhibitors of VEGF-R2, -R3, Aurora A, B, PLK-1 and FAK, a structurally modified class of new 2-anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidines **31j** with a similar inhibition profile was developed. In a screening against 21 cancer-related protein kinases particularly Aurora B, FAK, PLK1 and VEGF-R2 were inhibited in the low micromolar range. The 3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl-substituted compound **31j** turned out to be the most potent inhibitor in this series. Consequently **31j** was tested at the National Cancer Institute for antiproliferative activity towards approximately 60 tumor cell lines. **31j** showed an averaged GI₅₀-value in the low micromolar range comparable to Sorafenib and Sunitinib.



31j

The structural-related pyrido[2,3-*d*]pyrimidines **57** were also prepared in this context, but showed only poor kinase inhibitory activity. Because different products are possible as result of the performed reactions, the structure of **57** was unambiguously proven by two dimensional NMR-techniques and an X-ray structure analysis.

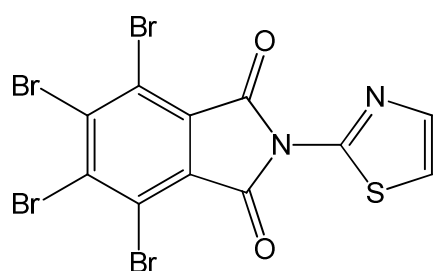


57a: R = CH₃

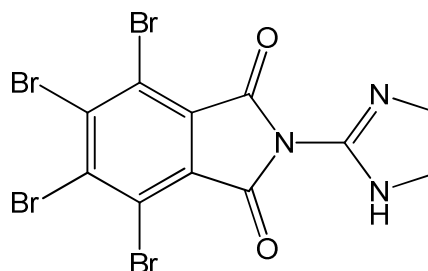
57b: R = H

6.2 Tetrabromoisindoles

The tetrabromoisindoles **67** were synthesized as potential CK2-inhibitors. In a screening against CK2 these analogues exhibited only weak inhibitory activity. When tested in the in vitro cell line screening project of the National Cancer Institute, the derivatives **67g** and **67l** failed to exhibit significant antiproliferative activity against the approximately 60 tumor cell lines in the panel.



67g

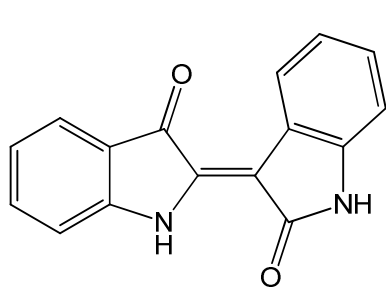
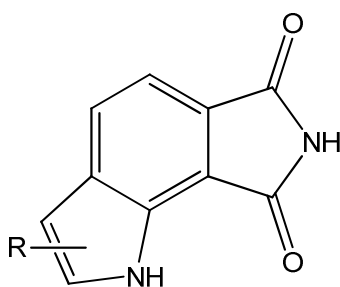
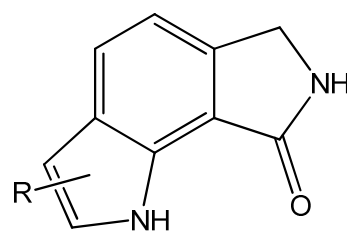


67l

Stability studies showed that most representatives of this compound class are stable for at least one week in DMSO solution at room temperature.

6.3 Mini-Indirubines

The new compound class of the mini-indirubines was developed as the third class of potential protein kinase inhibitors. These pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-diones **36** and dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ones **37** are structurally related to the established indirubine **21**.

**21****36****37**

In an assay towards 15 protein kinases some of the synthesized mini-indirubines exhibited significant inhibitory activities against CLKs and DYRKs.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Geräte und Methoden

Dünnschichtchromatographie

DC-Mikrokarten Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion unter UV-Licht bei 254 und 366 nm. Verwendete Fließmittel vorwiegend Gemische aus Ethylacetat und Toluol oder Cyclohexan.

Elementaranalysen

CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), analytisch

LaChrom Elite[®]: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt; Trennsäule: LiChroCART[®] 125-4, LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm), Fa. Merck, Darmstadt.

Probenvorbereitung: 1 mg Substanz wird in 500 µL DMSO gelöst. 200 µL dieser Lösung werden mit weiteren 500 µL DMSO verdünnt und durch einen Acrodisc[®] MHP 13 µm-Filter filtriert. Die Angestrebte Absorption des Hauptpeaks sollte im Bereich 300-1000 mAU liegen. Gegebenenfalls wurde die Probenkonzentration angepasst.

Elution: Injektionsvolumen 10 µL; Flussrate: 1.000 mL/min, isokratisch; Gesamtlaufzeit: 15 min; angestrebte Gesamtretentionszeit: 5-8 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser oder (Et₃NH)₂SO₄-Puffer (pH 2.6) im jeweils angegebenen Verhältnis. Pufferherstellung: 20 mL Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid mit bidestilliertem Wasser zu 1000 mL lösen und anschließend mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.6 einstellen.

Detektion: DAD bei 254 und 280 nm.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung mittels 100%-Methode; Angabe der Absorptionsmaxima (λ_{max}) aus den UV-Spektren des DAD; Integrationsausschluss: 1.55 min; Threshold 500; Bestimmung der Nettoretentions-

zeit t_N und der Totzeit t_M bezogen auf DMSO; Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), präparativ

LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser: 25 mm, ausgestattet mit einem Merck Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial Merck: LiChrospher® 100 RP-18 (12 μ m), Fa. Merck, Darmstadt; Probenschleife (max. Injektionsvolumen: 5 mL), Fa. Knauer, Berlin.

Elution: Flussrate: 40 mL/min; isokratisch.

Elutionsmittel: Gemische aus bidestilliertem Wasser und Acetonitril.

Detektion: 254 nm.

Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Vermessung der festen Substanzen als Kaliumbromid-Presslinge.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 (^1H -NMR-Messung: 400.1 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance II-600 (^1H -NMR-Messung: 600.1 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 150.9 MHz) Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig.

Verwendete Lösungsmittel: DMSO- d_6 und D_2O .

Interner Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala;

^1H -NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration;

^{13}C -NMR: Die Spektrenaufnahme erfolgte ^1H -breitbandentkoppelt. Der Zusatz (2C) weist auf ein überlagertes Signal zweier isochroner Kohlenstoff-Atome hin. Ferner wurde jeweils eine ^{13}C -DEPT135-Messung durchgeführt.

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, br = das Signal tritt verbreitert auf, ggf. Kombinationen von Multiplizitäten wie dd = Dublett vom Dublett; dt = Dublett vom Triplett.

Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, ungetrocknet verwendet. Die Trocknung erfolgte nach publizierten Methoden.¹⁶⁵

Acetonitril: Zuerst wird Acetonitril mit ca. 0.1 g/L KMnO_4 1 h auf 60 °C erwärmt und destilliert. Anschließend wird in einer Apparatur für Vakuumdestillation rektifiziert. Die Lagerung erfolgt über Molekularsieb 3 Å.

Ethanol: Absolutierter Ethanol (min. 99%) wird in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler mit Metallwendel (!) vorgelegt. Portionsweise werden unter Stickstoffbegasung ca. 7-10 g/L Natriumschnitzel hinzugefügt und solange erhitzt, bis das Natrium gelöst ist. Zu dieser Lösung werden ca. 30 g/L Phthalsäurediethylester hinzugegeben und die Mischung für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird bei Normaldruck abdestilliert. Der getrocknete Ethanol wird nach der Destillation über regeneriertem Molekularsieb (3 Å) gelagert.

Toluol: Toluol wird in einem Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr zum Rückfluss erhitzt und das sich im Wasserabscheider befindende Kondensat solange abgelassen, bis es nicht mehr getrübt ist. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden ca. 15 g/L Calciumchlorid hinzugefügt. Ein Tropftrichter mit Druckausgleich wird zwischen Rundkolben und Kühler integriert und bei geöffnetem Hahn 2-3 h zum Rückfluss erhitzt. Bei geschlossenem Hahn wird das getrocknete Toluol im Tropftrichter aufgefangen und über Molekularsieb 4 Å gelagert.

Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen; Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig; Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard Perfluorkerosin.

Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover; Chem Driver™ Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 mL mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

Röntgenkristallstruktur-Analysen

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers Bruker SMART 1000 CCD gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung vermessen; Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig.

Strukturauflösung: Direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: siehe Kapitel 7.2 (Synthesen und analytische Daten, röntgenographische Daten).

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 Å (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt.

Säulendurchmesser 2-3 cm; Füllhöhe 20-30 cm.

Säulenpackung: Kieselgel im Elutionsmittel aufschlämmen; Elutionsmittel für die entsprechenden Verbindungen sind in Kapitel 7.2 angegeben.

Schmelzpunkte

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

7.1.2 Bezug der Ausgangsmaterialien

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden überwiegend über Acros Organics (Geel, Belgien) oder Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

2-(4-Morpholinophenyl)guanidin **43d** wurde über Spoluka Chemical Company (aka Life Chemicals, Inc., Kiev, Ukraine) bezogen.

7-Aminoisoindolin-1-on **101** wurde über Enamine Ltd., Kiev, Ukraine bezogen.

7.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der 2-Anilino-4-(benzimidazol-2-yl)pyrimidine **31a-j**

Methode A:

3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) wird mit dem entsprechenden *N*-Phenylguanidiniumnitrat (**43**; 1.20 mmol) und Natriumhydroxid (48 mg, 1.2 mmol) in Propan-2-ol (5 mL) so lange zum Reflux erhitzt, bis laut dünnschichtchromatographischer Reaktionskontrolle kein Edukt mehr zu detektieren ist. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Methode B:

3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) wird mit dem entsprechenden *N*-Phenylguanidiniumnitrat (**43**; 1.20 mmol) in Propan-2-ol (5 mL) für 12 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Methode C:

3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) wird mit dem entsprechenden *N*-Phenylguanidiniumnitrat (**43**; 1.20 mmol) und Natriumhydroxid (48 mg, 1.2 mmol) in Propan-2-ol (5 mL) in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 150 °C für 90 min in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 250 Psi) gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit viel Wasser und Petrolether gewaschen. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Ethanol 96% und mittels präparativer HPLC (ACN/H₂O).

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Synthese der Pyrrolo[3,4-*g*]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dione (**36**)

Das jeweilige 4-(2-Hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97**; 0.25-0.75 mmol) wird in Polyphosphorsäure (2.4-9.0 g) vorsichtig unter Rühren auf 120 °C erwärmt und bis zur vollständigen Umsetzung bei 120 °C gerührt (dünnschichtchromatographische Kontrolle). Nach dem Abkühlen wird der Ansatz zu einem Eis-/Wasser-Gemisch (100 g) gegeben und mit 2 M Natriumhydroxid-Lösung neutralisiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und säulenchromatographisch gereinigt. Für die säulenchromatographische Trennung wird der isolierte Feststoff in Aceton aufgenommen, mit Kieselgel (1.5 g) versetzt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (3:1) über eine Säulenlänge von 25-30 cm. Die erhaltenen Fraktionen werden nach Entfernen des Elutionsmittels im Vakuum aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Synthese der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one (**37**)Methode A

2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid* (**102**; 200 mg, 1.00 mmol) wird mit einem entsprechenden Keton (**96**; 1.50 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol) in Eisessig (8 mL) 4 h bei 70-80 °C gerührt. Anschließend wird konzentrierte Schwefelsäure (0.1 mL) zugegeben und der Ansatz bis zur vollständigen Umsetzung bei 90-100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf eine 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung (50 mL) gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und säulenchromatographisch getrennt. Zur Vorbereitung wird der Feststoff in Aceton aufgenommen, mit Kieselgel (1.5 g) versetzt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Elution erfolgt mit dem angegebenen Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 20-25 cm. Die gewünschten Fraktionen werden anschließend nach Einengen des Elutionsmittels im Vakuum ggf. aus 50%igem Ethanol umkristallisiert.

Methode B

2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid* (**102**; 399 mg, 2.00 mmol) wird mit einem entsprechenden Keton (**96**; 3.00 mmol) und Natriumacetat (164 mg, 2.00 mmol) in Eisessig (10 mL) 7 h bei 70-80 °C gerührt. Anschließend wird konzentrierte Schwefelsäure (0.2 mL) zugegeben, die Temperatur auf 90-100 °C erhöht und der Ansatz bis zur vollständigen Reaktionsumsetzung gerührt. Nach dem Erkalten wird der Reaktionsansatz auf eine 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung (100 mL) gegossen, dreimal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die organische Phase wird mit Kieselgel (1.5 g) versetzt, im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt. Die Elution erfolgt mit Ethylacetat über eine Säulenlänge von 22 cm. Die gewünschten Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kapitel 7.2

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der Arylguanidiniumnitrate **43**

Das entsprechende Anilin-Derivat* (**39a**; 40 mmol) wird in Ethanol 96% (10-15 mL) gerührt. Anschließend wird zunächst 65%ige Salpetersäure (3.6 mL) und dann 50%ige wässrige Cyanamid-Lösung (5.0 mL, 76.2 mmol) zugetropft. Das Gemisch wird für 18 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach dem Abkühlen entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus Propan-2-ol umkristallisiert. Bei Ausbleiben einer Niederschlagsbildung kann diese durch Kühlen und Gießen in gekühlten Diethylether (200 mL) herbeigeführt werden. Der so entstandene Kristallbrei sollte zügig abgesaugt werden und dabei mit Ether bedeckt bleiben. Die Reinigung erfolgt ebenfalls durch Umkristallisation aus Propan-2-ol.

*Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 7.2

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese der Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (57a-b)

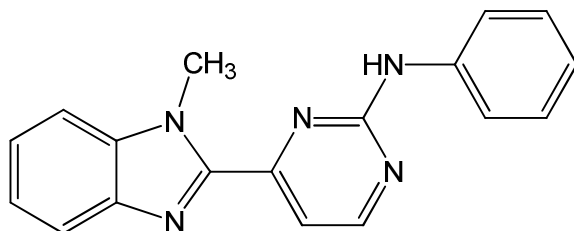
3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) wird mit dem entsprechenden 6-Aminouracil (**44**; 1.00 mmol) in Eisessig (8 mL) für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach dem Abkühlen entstandene Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat auf 5%ige Natriumacetat-Lösung (25 mL) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, mit dem anfangs isolierten Niederschlag vereinigt und aus Dimethylformamid/Wasser (7:1) umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Synthese der 4,5,6,7-Tetrabrom-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dione (67a-k)

Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 464 mg, 1.00 mmol) wird mit einem entsprechenden primären aromatischen Amin (**65a-k**; 1.00 mmol) in Eisessig (10 mL) 1-3 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach Abkühlen entstandene Niederschlag wird abgesaugt und nacheinander mit viel Wasser und etwas Petrolether gewaschen. Die Reinigung erfolgt wahlweise durch Soxhlet-Extraktion oder Umkristallisation aus dem angegebenen Lösungsmittel.

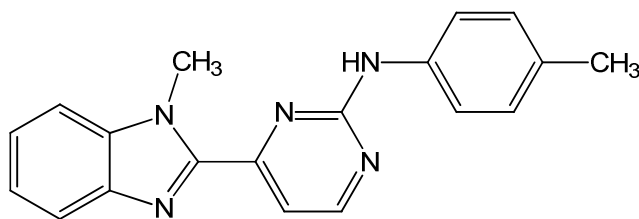
Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese der 4-(2-Hydrazinyl)isoindolin-1,3-dione (97)

2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 427 mg, 2.00 mmol) wird mit einem entsprechend substituierten Keton (**96**; 3.00 mmol) und Natriumacetat (164 mg, 2.00 mmol) in Eisessig (10 mL) bei 70-80 °C gerührt. Es wird so lange gerührt, bis laut dünnschichtchromatographischer Reaktionskontrolle kein Edukt mehr zu detektieren ist. Nach dem Erkalten wird der Reaktionsansatz auf eine 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung (50 mL) gegossen und der Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser und Petrolether gewaschen und ohne weitere Aufarbeitung weiterverarbeitet.

4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-*N*-phenylpyrimidin-2-amin (**31a**)

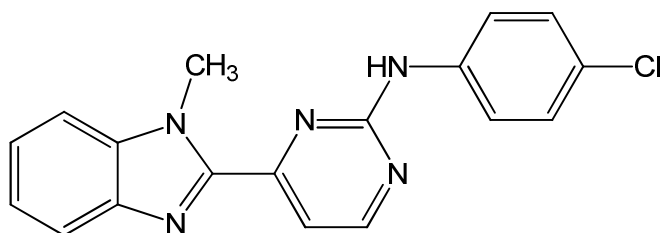
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 172 mg, 0.75 mmol) und *N*-Phenylguanidiniumnitrat (**43a**; 179 mg, 0.90 mmol). Reaktionsdauer: 15.5 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 104.6 mg (46.3%) eines farblosen Pulvers.

Schmp.: 200-204 °C; IR (KBr): 3250 cm⁻¹ und 3187 cm⁻¹ (NH), 3058 cm⁻¹ und 3020 cm⁻¹ (CH aromatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.29 (s, 3H, N-CH₃), 7.02 (m, 1H, ArH), 7.30-7.36 (m, 3H, ArH), 7.38-7.40 (m, 1H, ArH), 7.65 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.76-7.77 (m, 3H, ArH), 8.65 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.81 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.8 (CH₃); 110.9, 111.0, 119.6, 119.7, 121.9 (2C), 122.6, 123.8, 128.4 (2C), 159.0 (tert. C); 137.1, 139.9, 141.8, 147.7, 157.4, 159.5 (quart. C); C₁₈H₁₅N₅ (301.35); ber. C 71.74, H 5.02, N 23.24; gef. C 71.49, H 4.98, N 23.10; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 3.04 min, *t*_M(DMSO) = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40); λ_{max}: 279 nm.

4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-*N*-(4-methylphenyl)pyrimidin-2-amin (**31b**)

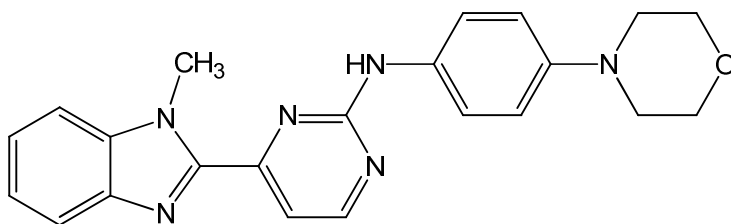
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(4-Methylphenyl)guanidinium-nitrat (**43b**; 255 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 20 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 76.8 mg (24.4%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 211-212 °C; IR (KBr): 3431 cm⁻¹ und 3265 cm⁻¹ (NH); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.28 (s, 3H, CH₃), 4.28 (s, 3H, N-CH₃), 7.14-7.15 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.30-7.33 (m, 1H, ArH), 7.37-7.40 (m, 1H, ArH), 7.62 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), teilweise überlagert mit 7.62-7.63 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.69-7.71 (m, 1H, ArH), 7.77 (td, 1H, *J* = 1.0/8.1 Hz, ArH), 8.62 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.70 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.3, 32.8 (CH₃); 110.6, 111.0 (2C), 119.7 (2C), 122.6, 123.8, 128.9 (2C), 159.0 (tert. C); 130.8, 137.1, 137.3, 141.8, 147.8, 157.4, 159.5 (quart. C); C₁₉H₁₇N₅ (315.37); ber. C 72.36, H 5.43, N 22.21; gef. C 72.19, H 5.25, N 22.09; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 4.69 min, *t*_M(DMSO) = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40); λ_{max}: 240 nm, 281 nm und 300 nm.

4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-*N*-(4-chlorphenyl)pyrimidin-2-amin (**31c**)

Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 234 mg, 1.02 mmol) und *N*-(4-Chlorphenyl)guanidiniumnitrat (**43c**; 279 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 105 mg (31.3%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 217-218 °C; IR (KBr): 3260 cm⁻¹ und 3188 cm⁻¹ (NH), 3050 cm⁻¹ (CH aromatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.29 (s, 3H, N-CH₃), 7.31-7.33 (m, 1H, ArH), 7.38-7.41 (m, 1H, ArH), überlagert von 7.40 (m, 2H, Teil vom AA'XX'-System, ArH), 7.68 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.70-7.72 (m, 1H, ArH), 7.76-7.78 (m, 1H, ArH), 7.79-7.82 (m, 2H, Teil eines AA'XX'-Systems, ArH), 8.67 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.95 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.8 (CH₃); 111.0, 111.3, 119.7 (2C), 120.9, 122.7, 123.8, 128.3 (2C), 159.0 (tert. C); 125.3, 137.1, 139.0, 141.8, 147.6, 157.4, 159.2 (quart. C); C₁₈H₁₄ClN₅ (335.37); ber. C 64.38, H 4.20, N 20.86; gef. C 64.27, H 4.17, N 20.68; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 5.32 min, *t*_M(DMSO) = 1.02 min (ACN/H₂O; 60:40); λ_{max}: 278 nm, 301 nm.

4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-*N*-(4-morpholinophenyl)pyrimidin-2-amin (**31d**)

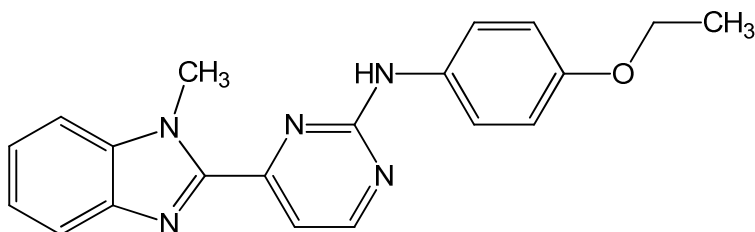
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 231 mg, 1.01 mmol) und 2-(4-Morpholinophenyl)guanidin (**43d**; 267 mg, 1.21 mmol). Reaktionsdauer: 6 h. Ein entstandener Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Das Filtrat bzw. der Reaktionsansatz wurde mit Kieselgel (1.5 g) versetzt und die Suspension am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde auf einer ca. 5 cm dicken Kieselgelschicht in einer Glasfritte gleichmäßig verteilt und mit Ethylacetat (250 mL) unter Anwendung von Vakuum eluiert. Die Ethylacetatphase wurde im Vakuum eingengt, die erhaltenen Feststoffe vereinigt und aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 49.8 mg (13%) eines gelben Pulvers.

Nach AAV 2, Methode B aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 234 mg, 1.02 mmol) und 2-(4-Morpholinophenyl)guanidin (**43d**; 266 mg, 1,21 mmol). Reaktionsdauer: 12 h. Umkristallisation aus Ethanol ergab 203.3 mg (53%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 210-212 °C; IR (KBr): 3435 cm⁻¹, 3256 cm⁻¹ und 3186 cm⁻¹ (NH), 3043 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2920 cm⁻¹ und 2851 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.05-3.07 (m, 4H, 2xCH₂), 3.74-3.76 (m, 4H, 2xCH₂), 4.26 (s, 3H, N-CH₃), 6.93-6.96 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.29-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H, ArH), 7.56 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), teilweise überlagert mit 7.57-7.58 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.75-7.77 (dt, 1H, *J* = 1.0/8.0 Hz, ArH), 8.58 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.9 (CH₃); 48.8 (2C), 66.2 (2C) (sek. C); 110.1, 111.0, 115.4 (2C), 119.7, 121.1 (2C), 122.6, 123.7, 159.0 (tert. C); 132.1, 137.1, 141.8, 146.6, 147.9, 157.4, 159.7 (quart. C); C₂₂H₂₂N₆O (386.45); ber. C 68.38, H 5.74, N 21.75; gef. C 68.31, H 5.54, N 21.57; HPLC: 99.8% bei 254

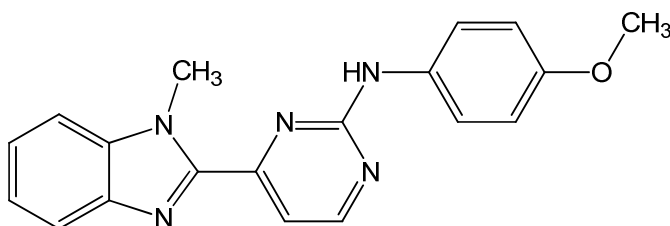
nm und 99.7% bei 280 nm; $t_N = 2.98$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.02$ min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 50:50); λ_{max} : 301 nm.

N-(4-Ethoxyphenyl)-4-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-amin (**31e**)



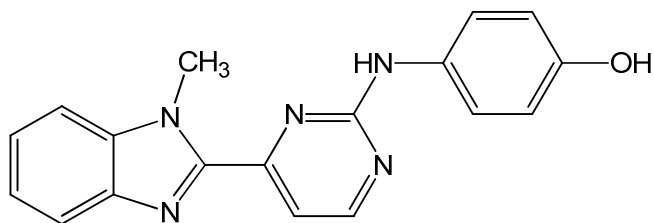
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 172 mg, 0.75 mmol) und *N*-(4-Ethoxyphenyl)guanidinium-nitrat (**43e**; 218 mg, 0.90 mmol). Reaktionsdauer: 22.5 h. Zweimalige Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 122.2 mg (47%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 164-165 °C; IR (KBr): 3429 cm^{-1} , 3252 cm^{-1} und 3195 cm^{-1} (NH), 3060 cm^{-1} (CH aromatisch), 2974 cm^{-1} und 2926 cm^{-1} (CH aliphatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.33 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, O-CH₂-CH₃), 4.00 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, O-CH₂-CH₃), 4.25 (s, 3H, N-CH₃), 6.90-6.93 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.29-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H, ArH), 7.58 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, Pyrimidin-H), teilweise überlagert mit 7.60 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.69 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 7.75-7.77 (dt, 1H, $J = 1.0/8.0$ Hz, ArH), 8.59 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, Pyrimidin-H), 9.59 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 14.7, 32.8 (CH₃); 63.0 (sek. C), 110.2, 111.0, 114.1 (2C), 119.7, 121.8 (2C), 122.6, 123.7, 159.0 (tert. C); 132.7, 137.1, 141.8, 147.8, 153.9, 157.4, 159.7 (quart. C); C₂₀H₁₉N₅O (345.41); ber. C 69.55, H 5.54, N 20.28; gef. C 68.64, H 5.48, N 20.02; MS (EI): m/z (%) = 345 [M]⁺ (85); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 345.15896, gef. 345.15956; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; $t_N = 3.71$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.02$ min (ACN/H₂O; 60:40); λ_{max} : 243 nm und 298 nm.

N-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-amin (**31f**)

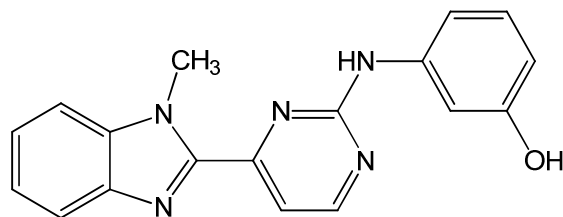
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(4-Methoxyphenyl)guanidinium-nitrat (**43f**; 275 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 15 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 181.3 mg (51.5%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 185-189 °C; IR (KBr): 3432 cm⁻¹, 3253 cm⁻¹ und 3193 cm⁻¹ (NH), 3032 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2950 cm⁻¹ und 2831 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.75 (s, 3H, O-CH₃), 4.25 (s, 3H, N-CH₃), 6.92-6.95 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.29-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H, ArH), 7.58 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.61 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.76 (m, 1H, ArH), 8.59 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.60 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.8, 55.1 (CH₃); 110.3, 111.0, 113.6 (2C), 119.7, 121.7 (2C), 122.6, 123.8, 159.1 (tert. C); 132.9, 137.1, 141.8, 147.8, 154.6, 157.4, 159.7 (quart. C); C₁₉H₁₇N₅O (331.38); ber. C 68.87, H 5.17, N 21.13; gef. C 68.56, H 5.21, N 21.06; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm; *t*_N = 5.00 min, *t*_M(DMSO) = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50); λ_{max}: 299 nm.

4-((4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenol (**31g**)

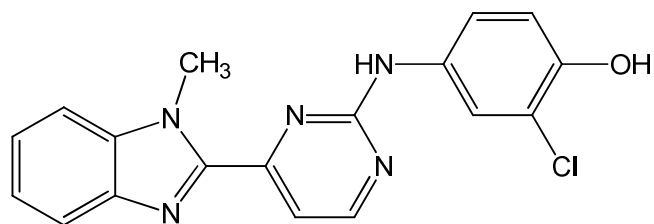
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(4-Hydroxyphenyl)guanidinium-nitrat (**43g**; 260 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 19 h. Zweimalige Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 176.5 mg (55.6%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 270-271 °C; IR (KBr): 3426 cm⁻¹ (OH), 3246 cm⁻¹ und 3115 cm⁻¹ (NH), 3043 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2933 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.23 (s, 3H, N-CH₃), 6.74-6.77 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.29-7.31 (m, 1H, ArH), 7.36-7.38 (m, 1H, ArH), 7.46 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.55 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.69 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.76 (m, 1H, ArH), 8.56 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.18 (s, 1H, OH), 9.46 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.7 (CH₃); 109.9, 111.0, 114.9 (2C), 119.7, 122.4 (2C), 122.6, 123.7, 159.0 (tert. C); 131.2, 137.1, 141.8, 147.8, 152.9, 157.3, 160.0 (quart. C); C₁₈H₁₅N₅O (317.35); ber. C 68.13, H 4.76, N 22.07; gef. C 67.76, H 4.96, N 21.78; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 3.78 min, t_M(DMSO) = 1.03 min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 35:65); λ_{max}: 241 nm und 300 nm.

3-((4-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenol (**31h**)

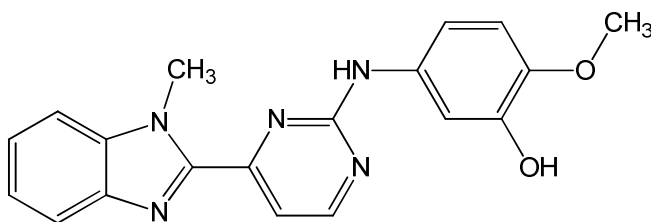
Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(3-Hydroxyphenyl)guanidinium-nitrat (**43h**; 260 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 20 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergab 165.7 mg (52.2%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 224-225 °C; IR (KBr): 3435 cm⁻¹ (OH), 3246 cm⁻¹ und 3190 cm⁻¹ (NH), 3064 cm⁻¹ (CH aromatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.30 (s, 3H, N-CH₃), 6.41-6.43 (m, 1H, ArH), 7.10 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.13-7.15 (m, 1H, ArH), 7.30-7.33 (m, 1H, ArH), 7.35 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 7.38-7.40 (m, 1H, ArH), 7.63 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz, Pyrimidin-H), 7.72 (m, 1H, ArH), 7.78 (m, 1H, ArH), 8.65 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz, Pyrimidin-H), 9.35 (s, 1H, OH), 9.71 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.7 (CH₃); 106.5, 109.0, 110.4, 110.8, 111.0, 119.7, 122.7, 123.8, 129.1, 159.0 (tert. C); 137.1, 141.0, 141.8, 147.8, 157.4, 157.5, 159.4 (quart. C); C₁₈H₁₅N₅O (317.35); ber. C 68.13, H 4.76, N 22.07; gef. C 67.85, H 4.86, N 21.87; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 3.86 min, *t*_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/H₂O; 25:75); λ_{max}: 278 nm und 300 nm.

2-Chloro-4-((4-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenol (**31i**)

Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(4-Hydroxy-3-chlorophenyl)-guanidiniumnitrat (**43i**; 298 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 30 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% und anschließender Isolierung des Produktes mittels präparativer HPLC (ACN/H₂O, 45:55) wurden 40 mg (12%) eines gelben Pulvers erhalten.

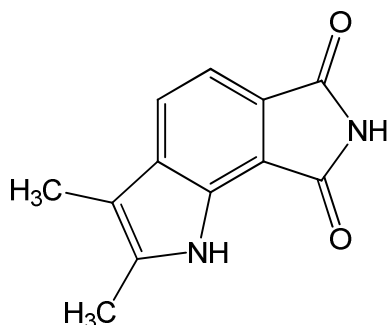
Schmp.: 239-241 °C; IR (KBr): 3403 cm⁻¹ (OH), 3253 cm⁻¹ und 3185 cm⁻¹ (NH), 3062 cm⁻¹ und 3038 cm⁻¹ (CH aromatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.27 (s, 3H, N-CH₃), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.30-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H, ArH), teilweise überlagert mit 7.41 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.76 (dt, 1H, *J* = 1.1/8.0 Hz, ArH), 7.81 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 8.61 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 9.62 (s, 1H, OH), 9.82 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.7 (CH₃); 110.6, 111.0, 116.3, 119.7, 120.2, 122.6, 123.8, 159.1 (tert. C); 118.9, 121.6, 132.3, 137.1, 141.8, 147.8, 148.2, 157.4, 159.6 (quart. C); C₁₈H₁₄ClN₅O (351.79); ber. C 61.46, H 4.01, N 19.91; gef. C 61.04, H 3.86, N 18.89; MS (EI): *m/z* (%) = 351 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 350.08086, gef. 350.07982; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; *t*_N = 2.94 min, *t*_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 45:55); λ_{max}: 242 nm und 301 nm.

2-Methoxy-5-((4-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenol (**31j**)

Nach AAV 2, Methode A aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-guanidiniumnitrat (**43j**; 293 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 30 h. Umkristallisation aus Ethanol 96%, anschließende säulenchromatographische Trennung mit Ethylacetat und Isolierung des Produktes mittels präparativer HPLC (ACN/H₂O, 40:60) ergab 25 mg (10%) eines gelben Pulvers.

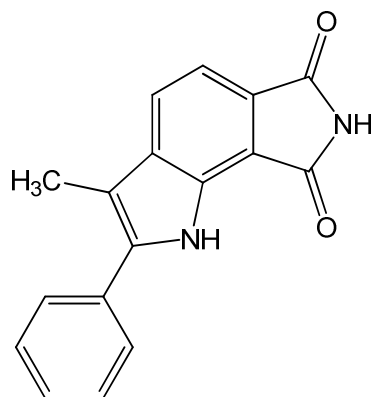
Nach AAV 2, Methode C aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und *N*-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-guanidiniumnitrat (**43j**; 293 mg, 1.20 mmol). Reaktionsdauer: 90 min. Umkristallisation aus Ethanol 96% und Isolierung des Produktes mittels präparativer HPLC (ACN/H₂O, 40:60) ergab 119 mg (34%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 181-183 °C; IR (KBr): 3397 cm⁻¹ (OH), 3245 cm⁻¹ (NH), 3065 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2950 cm⁻¹ und 2833 cm⁻¹ (CH aliphatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.75 (s, 3H, O-CH₃), 4.27 (s, 3H, N-CH₃), 6.88 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.05-7.07 (dd, 1H, *J* = 8.6/2.5 Hz, ArH), 7.28 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 7.30-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H, ArH), 7.57 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.76 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 8.59 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, Pyrimidin-H), 8.96 (s, 1H, OH), 9.49 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 32.7, 55.9 (CH₃); 108.6, 110.2, 110.8, 111.0, 112.5, 119.7, 122.6, 123.7, 159.0 (tert. C); 133.5, 137.1, 141.8, 143.2, 146.3, 147.9, 157.4, 159.7 (quart. C); C₁₉H₁₇N₅O (347.37); ber. C 65.70, H 4.93, N 20.16; gef. C 65.32, H 4.98, N 19.85; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 3.16 min, *t*_M(DMSO) = 1.02 min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 40:60); λ_{max}: 303 nm.

2,3-Dimethylpyrrolo[3,4-g]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dion (**36d**)

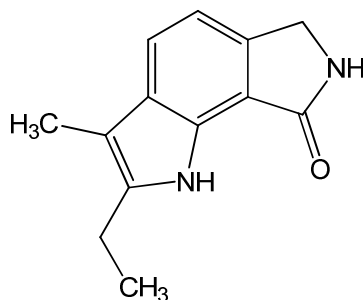
Nach AAV 6 aus 4-(2-Butan-2-yliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97d**; 175 mg, 0.75 mmol) und Polyphosphorsäure (9.0 g). Reaktionsdauer: 7 h. Säulenchromatographische Trennung mit Toluol/Ethylacetat (3:1) mit anschließender Umkristallisation aus Ethanol ergab 20 mg (12%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 329-330 °C; IR (KBr): 3365 cm⁻¹ (NH), 3179 cm⁻¹ und 3058 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1763 cm⁻¹ und 1710 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 10.87 (s, 1H, Imid-NH), 11.68 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 8.0, 11.3 (CH₃); 112.3, 122.5 (tert. C); 107.2, 114.1, 124.9, 128.0, 135.5, 138.0, 169.8, 170.8 (quart. C); C₁₂H₁₀N₂O₂ (214.22); ber. C 67.28, H 4.71, N 13.08; gef. C 66.99, H 4.52, N 12.71; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm; t_N = 2.82 min, t_M(DMSO) = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60); λ_{max}: 265 und 349 nm.

3-Methyl-2-phenylpyrrolo[3,4-g]indol-6,8(1*H*,7*H*)-dion (**36e**)

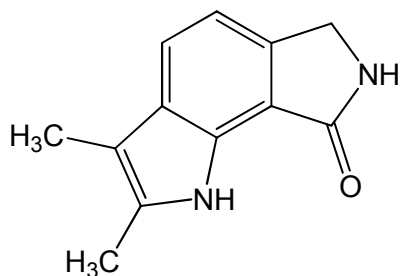
Nach AAV 6 aus 4-(2-(1-Phenylpropyliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97e**; 220 mg, 0.75 mmol) und Polyphosphorsäure (9.0 g). Reaktionsdauer: 10 h. Zweimalige säulenchromatographische Trennung mit Toluol/Ethylacetat (3:1) mit anschließender Umkristallisation aus Toluol/Ethylacetat (1:1) ergab 102 mg (49.2%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 287-289 °C; IR (KBr): 3317 cm^{-1} und 3280 cm^{-1} (NH), 3030 cm^{-1} (CH aromatisch), 2934 cm^{-1} und 2908 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1762 cm^{-1} und 1732 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH_3), 7.42-7.45 (m, 1H, ArH), überlagert von 7.45 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.52-7.54 (m, 2H, ArH), 7.72-7.74 (m, 2H, ArH), 7.95 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 10.96 (s, 1H, Imid-NH), 12.04 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.5 (CH_3); 112.8, 124.0, 128.0, 128.3 (2C), 128.9 (2C) (tert. C); 108.7, 115.0, 126.6, 128.9, 131.3, 135.9, 140.3, 169.4, 170.5 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (276.29); ber. C 73.90, H 4.38, N 10.14; gef. C 74.0, H 4.33, N 10.08; HPLC: 97.7% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm; $t_N = 4.01$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.03$ min (ACN/ H_2O ; 50:50); λ_{max} : 232, 271 und 357 nm.

2-Ethyl-3-methyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**37c**)

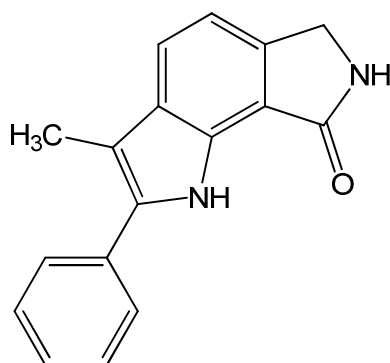
Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 291 mg, 1.00 mmol) und 3-Pentanon (**96c**; 160 μ L, 1.51 mmol). Reaktionsdauer: 10 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat/Cyclohexan (3:1) ergab 53 mg (25%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 219-221 $^{\circ}$ C; IR (KBr): 3420 cm^{-1} und 3274 cm^{-1} (NH), 2970 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} und 2867 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1666 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.18 (t, 3H, J = 7.7 Hz, CH_3), 2.20 (s, 3H, CH_3), 2.74 (q, 2H, J = 7.7 Hz, CH_2), 4.40 (s, 2H, CH_2), 7.09 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.59 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.30 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.05 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 8.2, 14.7 (CH_3); 18.6, 45.4 (sek. C); 112.8, 121.1 (tert. C); 104.6, 115.2, 129.0, 129.1, 137.9, 138.3, 170.7 (quart. C); $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (214.26); ber. C 72.87, H 6.59, N 13.07; gef. C 71.62, H 6.85, N 11.64; MS (EI): m/z (%) = 214 $[\text{M}]^{++}$ (90); HRMS (EI): m/z $[\text{M}-\text{H}]^+$ ber. 214.11061, gef. 214.11006; HPLC: 96.5% bei 254 nm und 95.2% bei 280 nm; t_N = 4.01 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/ H_2O ; 45:55); λ_{max} : 235 und 311 nm.

2,3-Dimethyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on (**37d**)

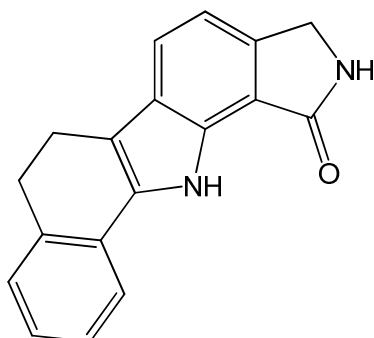
Nach AAV 7, Methode B aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 610 mg, 2.00 mmol) und 2-Butanon (**96d**, 270 μ L, 3.03 mmol). Reaktionsdauer: 25 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat ergab 154 mg (38.5%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 219-221 $^{\circ}$ C; IR (KBr): 3355 cm^{-1} (NH), 2914 cm^{-1} und 2856 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1712 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 4.40 (s, 2H, CH₂), 7.09 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.57 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.29 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.08 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 8.3, 11.0 (CH₃); 45.4 (sek. C); 112.8, 120.9 (tert. C); 105.4, 115.1, 129.1, 129.1, 132.3, 137.7, 170.7 (quart. C); C₁₂H₁₆N₂O (200.24); ber. C 71.98, H 6.04, N 13.99; gef. C 71.39, H 5.99, N 13.64; MS (EI): m/z (%) = 200 [M]⁺⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M-H]⁺ ber. 199.08659, gef. 199.08591; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm; t_N = 3.58 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/H₂O; 40:60); λ_{max} : 235 und 310 nm.

3-Methyl-2-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (37e)

Nach AAV 7, Methode B aus 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 621 mg, 2.00 mmol) und Propiophenon (**96e**; 405 μ L, 3.01 mmol). Reaktionsdauer: 23 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat ergab 185 mg (35.3%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 209-212 °C; IR (KBr): 3462 cm^{-1} (NH), 3181 cm^{-1} und 3069 cm^{-1} (CH aromatisch), 2966 cm^{-1} , 2911 cm^{-1} und 2857 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1699 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.42 (s, 3H, CH_3), 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.21 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.35-7.37 (m, 1H, ArH), 7.47-7.49 (m, 2H, ArH), 7.69-7.71 (m, 2H, ArH), 7.77 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.40 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.35 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.7 (CH_3); 45.5 (sek. C); 113.8, 122.2, 127.0, 128.2 (2C), 128.4 (2C) (tert. C); 107.6, 115.9, 129.6, 130.1, 132.3, 135.0, 139.8, 170.5 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (262.31); ber. C 77.84, H 5.38, N 10.68; gef. C 77.66, H 5.41, N 10.4; MS (EI): m/z (%) = 262 $[\text{M}]^{+}$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M-H}]^{+}$ ber. 261.10224, gef. 261.10168; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm; $t_N = 4.87$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/ H_2O ; 50:50); λ_{max} : 243, 269 und 322 nm.

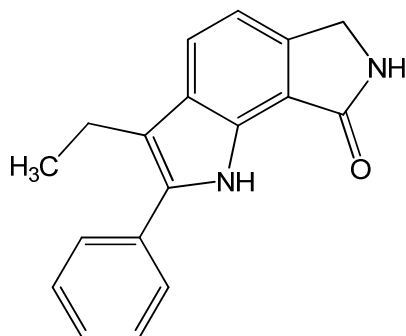
2,3,6,7-Tetrahydrobenzo[a]pyrrolo[3,4-*i*]carbazol-1(12*H*)-on (**37g**)

In Stickstoffatmosphäre wurde 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 637 mg, 2.00 mmol) mit α -Tetralon (**96g**; 400 μ L, 3.01 mmol) und Natriumacetat (164 mg, 2.00 mmol) in Eisessig (10 mL) 3 h bei 70-80 °C gerührt. Anschließend wurde konzentrierte Schwefelsäure (0.2 mL) zugegeben, die Temperatur auf 90-100 °C erhöht und der Ansatz für weitere 4 h gerührt. Nach dem Erkalten wurde der Reaktionsansatz in eine 5%ige wässrige Natriumacetat-Lösung (100 mL) gegossen, dreimal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die organische Phase wurde mit Kieselgel (1.5 g) versetzt, im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und das so erhaltene Feststoffgemisch säulenchromatographisch gereinigt. Die Elution erfolgte mit Ethylacetat über eine Säulenlänge von 22 cm. Die gewünschten Fraktionen wurden aufgefangen und anschließend (nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle) am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Ethylacetat wurden 216 mg (39.4%) eines orangen Pulvers erhalten.

Schmp.: 292-294 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.91-2.94 (m, 2H, CH_2), 2.97-3.01 (m, 2H, CH_2), 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.19 (m, 2.11H, ArH), 7.22-7.28 (m, 2.13H, ArH), 7.73 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.10-8.11 (dd, 1H, $J = 0.9/7.8$ Hz, ArH), 8.42 (s, 1H, NH), 11.7 (s, 1H, NH), $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 19.2, 29.0, 45.5 (sek. C); 114.0, 121.9, 122.3, 126.5 (2C), 127.9 (tert. C); 111.5, 116.2, 126.9, 128.9, 131.2, 134.0, 135.8, 139.7, 170.4 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (274.3); HPLC: 88.5% bei 254 nm und 95.0% bei 280 nm; $t_N = 4.42$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/ H_2O ; 55:45); λ_{max} : 248, 286 und 342 nm.

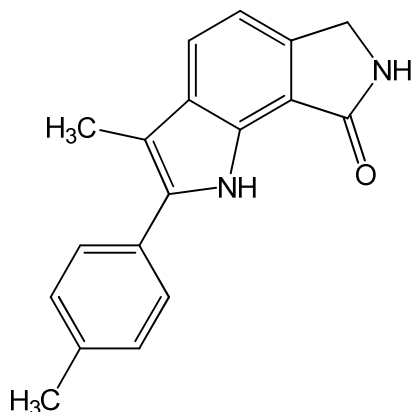
Eine Elementaranalyse wurde nicht durchgeführt, da in der Probe mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie eine Verunreinigung von 5% der ungesättigten Verbindung **106** detektiert wurde, die chromatographisch nicht abgetrennt werden konnte.

3-Ethyl-2-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**37h**)



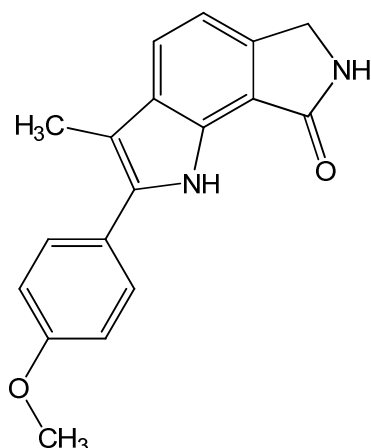
Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 297 mg, 1.00 mmol) und Butyrophenon (**96h**; 220 μL , 1.51 mmol). Reaktionsdauer: 12 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat mit anschließender Umkristallisation aus 50%igem Ethanol ergab 79 mg (28.6%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 219-221 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3429 cm^{-1} und 3274 cm^{-1} (NH), 3067 cm^{-1} (CH aromatisch), 2968 cm^{-1} , 2948 cm^{-1} und 2898 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1681 cm^{-1} und 1641 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH_3), 2.85 (q, 2H, J = 7.7 Hz, CH_2), 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.20 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.35-7.39 (m, 1H, ArH), 7.46-7.50 (m, 2H, Hz, ArH), 7.62-7.65 (m, 2H, Hz, ArH), 7.79 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.37 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.29 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 15.7 (CH_3); 17.3, 45.5 (sek. C); 113.8, 122.2, 127.2, 128.2 (2C), 128.5 (2C) (tert. C); 114.3, 116.0, 128.6, 130.3, 132.3, 134.7, 139.6, 170.4 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (276.34); ber. C 78.24, H 5.84, N 10.14; gef. C 78.04, H 5.72, N 9.99; MS (EI): m/z (%) = 276 $[\text{M}]^{+}$ (62); HRMS (EI): m/z $[\text{M}-\text{H}]^{+}$ ber. 276.12626, gef. 276.12571; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm; t_N = 4.37 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/ H_2O ; 55:45); λ_{max} : 242, 268 und 320 nm.

3-Methyl-2-(4-methylphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (37i)

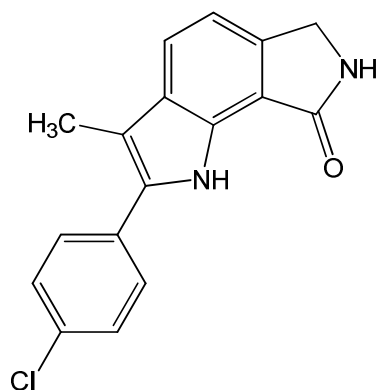
Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 297 mg, 1.00 mmol) und 4'-Methylpropiophenon (**96i**; 224 μ L, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 8 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat und anschließender Umkristallisation aus 50%igem Ethanol ergab 77 mg (27.9%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 231-235 °C; IR (KBr): 3445 cm^{-1} und 3279 cm^{-1} (NH), 3182 cm^{-1} und 3062 cm^{-1} (CH aromatisch), 2919 cm^{-1} und 2854 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1688 cm^{-1} und 1671 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.37 (s, 3H, CH_3), 2.40 (s, 3H, CH_3), 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.19 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.28-7.30 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.57-7.60 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.74 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.38 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.25 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.73, 20.7 (CH_3); 45.5 (sek. C); 113.7, 122.0, 128.3 (2C), 128.8 (2C) (tert. C); 107.2, 115.8, 129.6, 129.8, 130.1, 135.0, 136.3, 139.6, 170.5 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (276.33); ber. C 78.24, H 5.84, N 10.14; gef. C 77.62, H 5.69, N 9.96; MS (EI): m/z (%) = 276 $[\text{M}]^{+}$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M-H}]^{+}$ ber. 275.11789, gef. 275.11815; HPLC: 97.8% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm; $t_N = 3.67$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/ H_2O ; 60:40); λ_{max} : 248, 268 und 322 nm.

2-(4-Methoxyphenyl)-3-methyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on (37j)

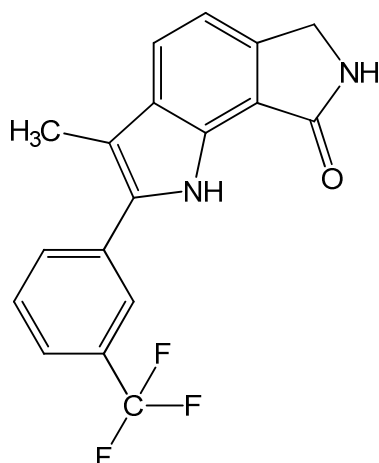
Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 289 mg, 1.00 mmol) und 4'-Methoxypropiophenon (**96j**, 265 μ L, 1.51 mmol). Reaktionsdauer: 11 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat ergab 74 mg (25.3%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 209-212 °C; IR (KBr): 3421 cm^{-1} und 3259 cm^{-1} (NH), 2990 cm^{-1} und 2953 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1680 cm^{-1} und 1653 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.38 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 4.44 (s, 2H, CH_2), 7.02-7.06 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.18 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.61-7.64 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.73 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.36 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.21 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.7, 55.1 (CH_3); 45.5 (sek. C); 113.6, 113.7 (2C), 121.8, 129.7 (2C) (tert. C); 106.5, 115.7, 124.8, 129.8, 130.0, 135.0, 139.3, 158.4, 170.5 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ (292.34); ber. C 73.96, H 5.52, N 9.58; gef. C 72.85, H 5.52, N 9.25; MS (EI): m/z (%) = 292 $[\text{M}]^{++}$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M-H}]^+$ ber. 291.11280, gef. 291.11291; HPLC: 96.9% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm; $t_N = 4.62$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/ H_2O ; 50:50); λ_{max} : 267 und 322 nm.

2-(4-Chlorophenyl)-3-methyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (37k)

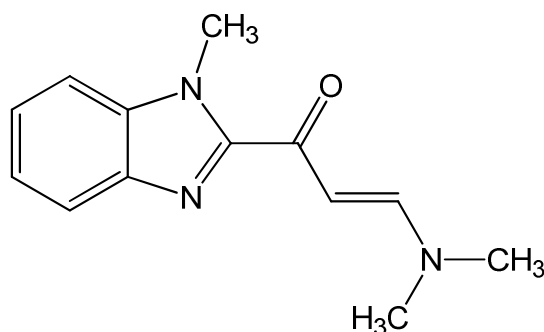
Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 293 mg, 1.00 mmol) und 4'-Chlorpropiophenon (**96k**; 254 mg, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 10 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat ergab 124 mg (41.8%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 231-235 °C; IR (KBr): 3363 cm⁻¹ (NH), 3154 cm⁻¹ und 3114 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2969 cm⁻¹, 2917 cm⁻¹ und 2858 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1675 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 4.45 (s, 2H, CH₂), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.52-7.54 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.70-7.72 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.78 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 8.40 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.47 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.7 (CH₃); 45.5 (sek. C); 113.9, 122.3, 128.1 (2C), 130.2 (2C) (tert. C); 108.2, 116.0, 129.5, 130.2, 131.2, 131.6, 133.7, 140.1, 170.4 (quart. C); C₁₇H₁₃ClN₂O (296.76); ber. C 68.81, H 4.42, N 9.44; gef. C 68.50, H 4.38, N 9.21; MS (EI): *m/z* (%) = 296 [M]⁺⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺⁺ ber. 296.07164, gef. 296.07109; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm; *t*_N = 4.23 min, *t*_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/H₂O; 60:40); λ_{max}: 243, 276 und 323 nm.

3-Methyl-2-(3-(trifluormethyl)phenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (37I)

Nach AAV 7, Methode A aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**; 297 mg, 1.00 mmol) und 3'-(Trifluormethyl)propiophenon (**96I**; 265 μ L, 1.51 mmol). Reaktionsdauer: 8 h. Säulenchromatographische Reinigung mit Ethylacetat ergab 141 mg (42.9%) eines gelben Pulvers.

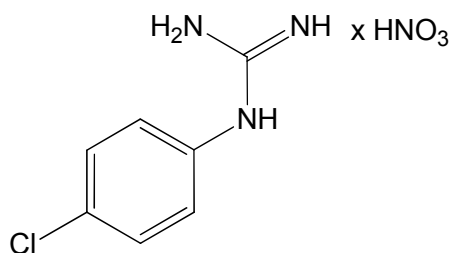
Schmp.: 209-212 $^{\circ}$ C; IR (KBr): 3379 cm^{-1} (NH), 3159 cm^{-1} und 3119 cm^{-1} (CH aromatisch), 2916 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1677 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.44 (s, 3H, CH_3), 4.47 (s, 2H, CH_2), 7.23 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.70-7.73 (m, 2H, ArH), 7.81 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.97-7.99 (m, 1H, ArH), 8.06 (br s, 1H, ArH), 8.43 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.71 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.7 (CH_3); 45.5 (sek. C); 114.0, 122.5, 123.4 (q, $^3J_{\text{C,F}}$ = 3.7 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 125.1 (q, $^3J_{\text{C,F}}$ = 3.7 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 129.2, 132.3 (tert. C); 108.9, 116.1, 124.2 (q, $^1J_{\text{C,F}}$ = 272 Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 129.0 (q, $^2J_{\text{C,F}}$ = 31.7 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 129.4, 130.4, 133.2, 133.4, 140.4, 170.3 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$ (330.31); ber. C 65.45, H 3.97, N 8.48; gef. C 65.2, H 3.84, N 8.24; MS (EI): m/z (%) = 330 $[\text{M}]^{++}$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^{++}$ ber. 330.09800, gef. 330.09745; HPLC: 97.2% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm; t_N = 4.21 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/ H_2O ; 60:40); λ_{max} : 240, 278 und 322 nm.

3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**)

2-Acetyl-1-methyl-1*H*-benzimidazol (**38**; 1.74 g, 10.0 mmol) wurde mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (34 mL) für 2.5 h bei 115-120 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Toluol/Petrolether (1:1). Es wurden 1.75 g (75.5%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 146-148 °C (Lit.⁹⁸: 150 °C); IR (KBr): 1639 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 2.94 (s, 3H, CH₃), 3.19 (s, 3H, CH₃), 4.11 (s, 3H, CH₃), 6.25 (br s, 1H, CH), 7.26-7.30 (m, 1H, ArH), 7.33-7.37 (m, 1H, ArH), 7.60-7.62 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.2 Hz, ArH), 7.72-7.75 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0, ArH), 7.82 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, CH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.8, 37.1, 44.6 (CH₃); 110.7 (2C), 120.1 (2C), 122.4, 123.7 (tert. C); 136.5, 141.1, 148.9, 179.3 (quart. C); C₁₃H₁₅N₃O (229.28); ber. C 68.10, H 6.59, N 18.33; gef. C 67.90, H 6.71, N 18.20; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 3.57 min, *t*_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/H₂O; 20:80); λ_{max}: 247 nm, 305 nm und 363 nm.

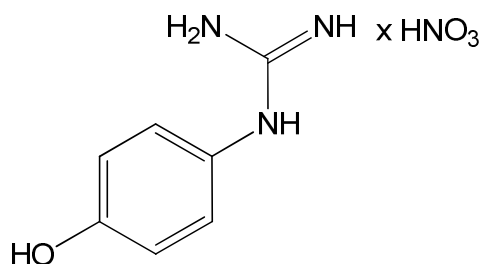
N-(4-Chlorphenyl)guanidiniumnitrat (**43c**)



Nach AAV 1 aus 4-Chloranilin (**42c**; 2.55 g, 20.0 mmol). Reaktionsdauer: 18 h.
Umkristallisation aus Propan-2-ol ergab 2.8 g (60%) violette Kristalle.

Schmp.: 163-164 °C (Lit.⁹²: 163 °C)

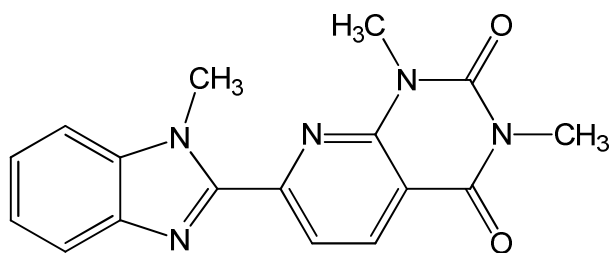
N-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43g**)



Nach AAV 1 aus 4-Aminophenol (**42g**; 4.37 g, 40.0 mmol). Reaktionsdauer: 19.5 h.
Umkristallisation aus Propan-2-ol ergab 2.25 g (26.2%) violette Kristalle.

Schmp.: 200-202 °C (Lit.⁹²: 201 °C)

1,3-Dimethyl-7-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**57a**)



Nach AAV 3 aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und 6-Amino-1,3-dimethyluracil (**44a**; 155 mg, 1.00 mmol). Umkristallisation aus DMF/H₂O (7:1) ergab 113.3 mg (35.3%) farblose Nadeln.

Schmp.: 303-304 °C; IR (KBr): 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1702 cm⁻¹ und 1654 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 3.40 (s, 3H, N-CH₃), 3.73 (s, 3H, N-CH₃), 4.43 (s, 3H, N-CH₃), 7.69-7.74 (m, 2H, ArH), 7.96-7.98 (dd, 1H, *J* = 7.5/1.2 Hz, ArH), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 8.22 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Pyridin-H), 8.80 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Pyridin-H). Da Verbindung **57a** in den üblichen Lösungsmitteln schlecht löslich ist, konnte kein Standard-¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen werden. Das ¹³C-DEPT-NMR konnte unter Zusatz von Trifluoressigsäure aufgenommen werden. ¹³C-DEPT-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.5, 29.9, 34.2 (CH₃); 113.6, 115.6, 120.3, 126.8, 127.2, 139.4 (tert. C); C₁₇H₁₅N₅O₂ (321.34); ber. C 63.54, H 4.71, N 21.79; gef. C 63.32, H 4.84, N 21.65; HPLC: 97.8% bei 254 nm und 95.9% bei 280 nm; *t*_N = 2.16 min, *t*_M(DMSO) = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50); λ_{max}: 353 nm.

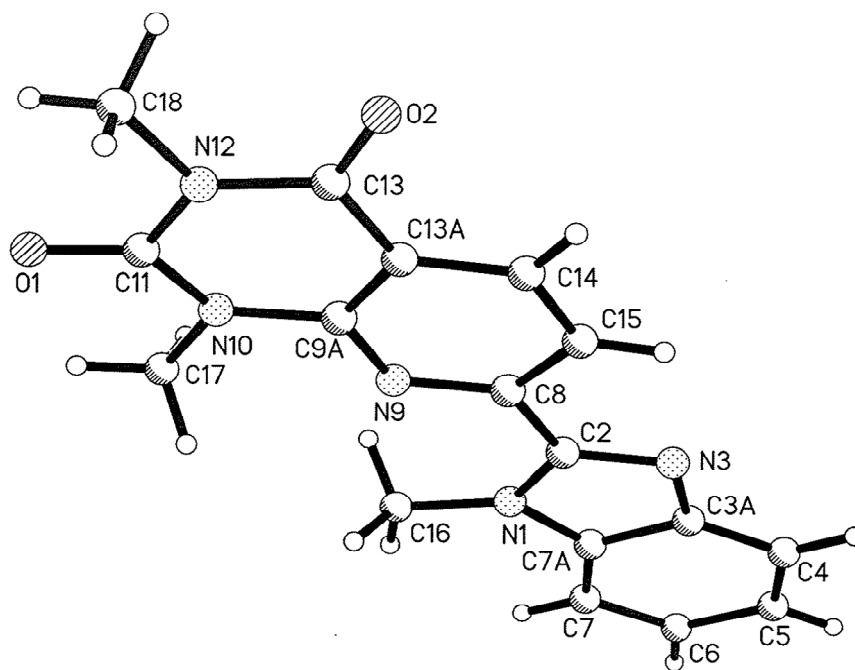


Abbildung 7-1: Röntgenkristallstruktur von **57a**^a

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Kristalldaten und Strukturverfeinerung:

Summenformel:	$C_{17}H_{15}N_5O_2$
Mr:	321.34
Temperatur:	100(2) K
Wellenlänge:	0.71073 Å
Kristallsystem:	Triclinic
Raumgruppe:	P(-1)
Gitterkonstanten:	$a = 8.0722(3) \text{ Å}$ $\alpha = 88.817(4)^\circ$ $b = 8.9740(4) \text{ Å}$ $\beta = 86.437(3)^\circ$ $c = 13.9020(7) \text{ Å}$ $\gamma = 81.945(4)^\circ$
Volumen:	$720.04(5) \text{ Å}^3$
Z:	2
Dichte (berechnet):	1.482 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient:	0.102 mm^{-1}
F(000):	336
Kristallgröße:	$0.20 \times 0.16 \times 0.08 \text{ mm}^3$
θ -Bereich für die Datensammlung:	3.04 bis 28.28°
Limitierende Indices:	$-10 \leq h \leq 10$, $-11 \leq k \leq 11$, $-3 \leq l \leq 13$
Zahl der Reflexe:	16992
Unabhängige Reflexe:	3564 [$R(\text{int}) = 0.0431$]
Vollständigkeit bis $\theta = 28.28^\circ$:	99.7%
Absorptionskorrektur:	None
Verfeinerungsmethode:	Full-matrix least-squares on F^2
Daten/Einschränkungen/Parameter:	3564 / 0 / 220
Goodness-of-fit on F^2 :	0.800
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]:	$R1 = 0.0380$, $wR2 = 0.0746$
R indices (alle Daten):	$R1 = 0.0774$, $wR2 = 0.0784$
Größte Differenzpeaks:	0.261 und -0.247 e.Å^{-3}

Tabelle 7-1: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)^{a,b,c}

	x	y	z	U(eq)
N(1)	4048.5(14)	374.0(13)	3232.5(11)	13.9(3)
N(3)	3358.6(14)	2610.2(13)	4248.4(11)	14.8(3)
N(9)	2065.5(14)	-931.9(13)	5368.3(11)	14.4(3)
N(10)	1025.4(14)	-2995.4(13)	6358.7(11)	14.9(3)
N(12)	-662.4(14)	-2790.9(13)	8371.2(11)	15.3(3)
O(1)	196.3(13)	-5066.3(11)	7408.5(10)	21.0(3)
O(2)	-1523.7(12)	-522.2(11)	9329.2(9)	19.6(3)
C(2)	3203.7(17)	1162.0(16)	4290.8(13)	13.7(3)
C(3A)	4349.4(17)	2798.1(17)	3107.3(13)	15.0(3)
C(4)	4906.3(18)	4108.1(17)	2571.4(14)	19.5(4)
C(5)	5914.6(19)	3973.1(18)	1416.3(14)	21.1(4)
C(6)	6369.0(18)	2580.0(18)	791.7(14)	21.5(4)
C(7)	5820.7(17)	1280.1(17)	1290.4(14)	18.1(3)
C(7A)	4802.6(17)	1417.7(16)	2462.3(13)	14.1(3)
C(8)	2216.7(17)	536.7(16)	5387.5(13)	13.5(3)
C(9A)	1140.9(17)	-1468.0(16)	6370.1(13)	13.2(3)
C(11)	196.8(18)	-3707.3(17)	7372.3(13)	15.6(3)
C(13)	-691.9(17)	-1240.6(16)	8440.3(13)	15.1(3)
C(13A)	317.1(17)	-584.0(16)	7400.2(13)	12.9(3)
C(14)	513.0(17)	931.2(16)	7400.8(13)	15.0(3)
C(15)	1468.7(17)	1507.0(16)	6399.9(13)	14.9(3)
C(16)	4170.6(18)	-1220.3(15)	2903.7(14)	18.3(3)
C(17)	1908.7(18)	-3919.1(16)	5275.4(13)	19.3(4)
C(18)	-1607.9(18)	-3513.3(16)	9433.1(14)	18.5(3)

^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

^c U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.

Tabelle 7-2: Bindungslängen [Å]^{a,b}

N(1)-C(2)	1.3799(16)	O(2)-C(13)	1.2223(16)
N(1)-C(7A)	1.3854(17)	C(2)-C(8)	1.4687(19)
N(1)-C(16)	1.4636(17)	C(3A)-C(7A)	1.402(2)
N(3)-C(2)	1.3226(17)	C(3A)-C(4)	1.402(2)
N(3)-C(3A)	1.3788(17)	C(4)-C(5)	1.374(2)
N(9)-C(9A)	1.3383(17)	C(5)-C(6)	1.403(2)
N(9)-C(8)	1.3411(17)	C(6)-C(7)	1.379(2)
N(10)-C(11)	1.3795(17)	C(7)-C(7A)	1.3919(19)
N(10)-C(9A)	1.3872(17)	C(8)-C(15)	1.4045(18)
N(10)-C(17)	1.4691(16)	C(9A)-C(13A)	1.3949(18)
N(12)-C(13)	1.3912(17)	C(13)-C(13A)	1.4520(19)
N(12)-C(11)	1.3981(17)	C(13A)-C(14)	1.3907(19)
N(12)-C(18)	1.4672(17)	C(14)-C(15)	1.3673(19)
O(1)-C(11)	1.2194(16)		

^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-3: Bindungswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

C(2)-N(1)-C(7A)	105.92(11)	N(1)-C(7A)-C(7)	131.99(13)
C(2)-N(1)-C(16)	130.08(11)	N(1)-C(7A)-C(3A)	105.75(11)
C(7A)-N(1)-C(16)	124.00(11)	C(7)-C(7A)-C(3A)	122.25(14)
C(2)-N(3)-C(3A)	105.09(11)	N(9)-C(8)-C(15)	123.22(13)
C(9A)-N(9)-C(8)	117.11(12)	N(9)-C(8)-C(2)	118.34(12)
C(11)-N(10)-C(9A)	122.53(11)	C(15)-C(8)-C(2)	118.44(12)
C(11)-N(10)-C(17)	118.18(11)	N(9)-C(9A)-N(10)	116.68(11)
C(9A)-N(10)-C(17)	119.16(11)	N(9)-C(9A)-C(13A)	123.75(13)
C(13)-N(12)-C(11)	125.09(11)	N(10)-C(9A)-C(13A)	119.57(12)
C(13)-N(12)-C(18)	117.14(11)	O(1)-C(11)-N(10)	122.47(12)
C(11)-N(12)-C(18)	117.76(12)	O(1)-C(11)-N(12)	120.84(13)
N(3)-C(2)-N(1)	113.05(12)	N(10)-C(11)-N(12)	116.69(12)
N(3)-C(2)-C(8)	120.65(12)	O(2)-C(13)-N(12)	120.55(12)
N(1)-C(2)-C(8)	126.30(12)	O(2)-C(13)-C(13A)	124.24(13)
N(3)-C(3A)-C(7A)	110.18(12)	N(12)-C(13)-C(13A)	115.21(12)
N(3)-C(3A)-C(4)	129.51(13)	C(14)-C(13A)-C(9A)	117.79(13)
C(7A)-C(3A)-C(4)	120.30(12)	C(14)-C(13A)-C(13)	121.60(12)
C(5)-C(4)-C(3A)	117.50(14)	C(9A)-C(13A)-C(13)	120.61(13)
C(4)-C(5)-C(6)	121.42(15)	C(15)-C(14)-C(13A)	119.77(12)
C(7)-C(6)-C(5)	122.15(14)	C(14)-C(15)-C(8)	118.33(13)
C(6)-C(7)-C(7A)	116.37(14)		

^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-4: Anisotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)^{a,b,c}

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
N(1)	14.3(7)	12.2(7)	14.9(6)	-0.2(5)	0.2(5)	-1.5(5)
N(3)	16.8(7)	12.5(7)	15.1(6)	0.9(5)	2.8(5)	-3.4(5)
N(9)	16.3(7)	12.4(7)	14.7(6)	1.1(5)	-1.5(5)	-2.7(5)
N(10)	17.7(7)	11.2(7)	15.7(6)	-1.0(5)	2.2(5)	-2.6(5)
N(12)	14.7(7)	16.0(7)	14.9(6)	2.0(5)	2.3(5)	-2.9(6)
O(1)	28.8(7)	11.2(6)	23.2(6)	1.1(4)	0.8(5)	-5.2(5)
O(2)	20.4(6)	19.9(6)	18.1(5)	-3.4(4)	5.0(5)	-3.5(5)
C(2)	14.2(8)	12.7(8)	14.1(7)	-1.2(6)	-1.6(6)	-0.8(6)
C(3A)	13.8(8)	16.6(8)	14.4(7)	1.7(6)	-1.7(6)	-1.9(6)
C(4)	21.4(9)	17.1(9)	20.3(8)	1.0(6)	-1.6(7)	-4.2(7)
C(5)	20.2(9)	21.8(9)	22.4(8)	7.1(6)	-2.9(7)	-7.9(7)
C(6)	16.1(8)	31.9(10)	17.0(8)	3.7(7)	0.7(7)	-6.8(7)
C(7)	15.4(9)	21.8(9)	16.4(7)	-0.6(6)	-0.9(7)	-0.5(7)
C(7A)	11.2(8)	15.8(8)	15.8(7)	2.4(6)	-2.0(6)	-3.0(6)
C(8)	14.4(8)	12.7(8)	13.8(7)	0.9(6)	-3.1(6)	-1.7(6)
C(9A)	12.6(8)	13.0(8)	14.2(7)	1.1(6)	-2.8(6)	-2.1(6)
C(11)	13.7(8)	16.6(9)	16.5(7)	0.7(6)	-1.4(6)	-2.4(7)
C(13)	14.2(8)	16.2(9)	15.5(7)	0.7(6)	-3.9(6)	-3.2(7)
C(13A)	9.8(8)	13.7(8)	15.1(7)	-0.3(6)	-0.7(6)	-1.4(6)
C(14)	16.6(8)	12.6(8)	15.2(7)	-5.1(6)	-1.0(6)	0.9(6)
C(15)	18.4(9)	11.0(8)	15.6(7)	-1.6(6)	-0.5(6)	-2.4(7)
C(16)	21.5(9)	13.7(8)	19.3(8)	-4.3(6)	2.7(7)	-2.3(7)
C(17)	26.3(9)	12.6(8)	18.4(8)	-3.3(6)	3.8(7)	-2.7(7)
C(18)	21.0(9)	15.9(9)	18.4(8)	3.9(6)	0.7(7)	-4.1(7)

^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

^c Der anisotropische Verschiebungsfaktorexponent errechnet sich durch: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

Tabelle 7-5: Wasserstoffkoordinaten ($\times 10^4$) and isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)^{a,b}

	x	y	z	U(eq)
H(4)	4598	5053	2991	23
H(5)	6312	4842	1032	25
H(6)	7078	2531	-1	26
H(7)	6121	342	858	22
H(14)	-15	1564	8094	18
H(15)	1623	2537	6389	18
H(16A)	4690	-1835	3623	27
H(16B)	4857	-1416	2071	27
H(16C)	3046	-1478	2797	27
H(17A)	1861	-4985	5480	29
H(17B)	3081	-3742	5183	29
H(17C)	1373	-3646	4440	29
H(18A)	-988	-3591	10245	28
H(18B)	-1762	-4522	9154	28
H(18C)	-2705	-2909	9610	28

^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

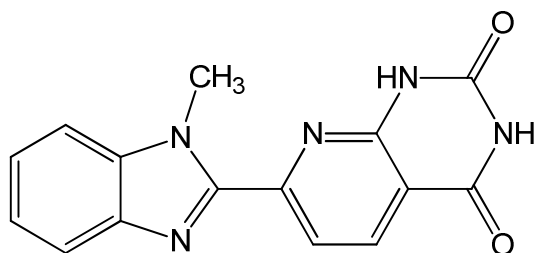
^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 7-6: Torsionswinkel [$^{\circ}$]^{a,b}

C(3A)-N(3)-C(2)-N(1)	0.15(16)	C(8)-N(9)-C(9A)-C(13A)	1.22(19)
C(3A)-N(3)-C(2)-C(8)	179.95(12)	C(11)-N(10)-C(9A)-N(9)	176.03(12)
C(7A)-N(1)-C(2)-N(3)	0.20(16)	C(17)-N(10)-C(9A)-N(9)	0.20(19)
C(16)-N(1)-C(2)-N(3)	-178.97(13)	C(11)-N(10)-C(9A)-C(13A)	-3.7(2)
C(7A)-N(1)-C(2)-C(8)	-179.59(13)	C(17)-N(10)-C(9A)-C(13A)	-179.51(13)
C(16)-N(1)-C(2)-C(8)	1.2(2)	C(9A)-N(10)-C(11)-O(1)	-174.68(14)
C(2)-N(3)-C(3A)-C(7A)	-0.44(16)	C(17)-N(10)-C(11)-O(1)	1.2(2)
C(2)-N(3)-C(3A)-C(4)	179.70(15)	C(9A)-N(10)-C(11)-N(12)	5.56(19)
N(3)-C(3A)-C(4)-C(5)	179.06(14)	C(17)-N(10)-C(11)-N(12)	-178.58(12)
C(7A)-C(3A)-C(4)-C(5)	-0.8(2)	C(13)-N(12)-C(11)-O(1)	177.84(13)
C(3A)-C(4)-C(5)-C(6)	0.2(2)	C(18)-N(12)-C(11)-O(1)	-2.1(2)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0.6(2)	C(13)-N(12)-C(11)-N(10)	-2.4(2)
C(5)-C(6)-C(7)-C(7A)	-0.8(2)	C(18)-N(12)-C(11)-N(10)	177.68(12)
C(2)-N(1)-C(7A)-C(7)	179.29(15)	C(11)-N(12)-C(13)-O(2)	177.62(13)
C(16)-N(1)-C(7A)-C(7)	-1.5(2)	C(18)-N(12)-C(13)-O(2)	-2.45(19)
C(2)-N(1)-C(7A)-C(3A)	-0.45(14)	C(11)-N(12)-C(13)-C(13A)	-2.39(19)
C(16)-N(1)-C(7A)-C(3A)	178.79(12)	C(18)-N(12)-C(13)-C(13A)	177.53(12)
C(6)-C(7)-C(7A)-N(1)	-179.59(14)	N(9)-C(9A)-C(13A)-C(14)	-1.9(2)
C(6)-C(7)-C(7A)-C(3A)	0.1(2)	N(10)-C(9A)-C(13A)-C(14)	177.76(13)
N(3)-C(3A)-C(7A)-N(1)	0.56(15)	N(9)-C(9A)-C(13A)-C(13)	178.77(12)
C(4)-C(3A)-C(7A)-N(1)	-179.56(12)	N(10)-C(9A)-C(13A)-C(13)	-1.5(2)
N(3)-C(3A)-C(7A)-C(7)	-179.20(12)	O(2)-C(13)-C(13A)-C(14)	5.1(2)
C(4)-C(3A)-C(7A)-C(7)	0.7(2)	N(12)-C(13)-C(13A)-C(14)	-174.92(13)
C(9A)-N(9)-C(8)-C(15)	0.4(2)	O(2)-C(13)-C(13A)-C(9A)	-175.67(14)
C(9A)-N(9)-C(8)-C(2)	-179.12(12)	N(12)-C(13)-C(13A)-C(9A)	4.35(19)
N(3)-C(2)-C(8)-N(9)	178.46(13)	C(9A)-C(13A)-C(14)-C(15)	1.0(2)
N(1)-C(2)-C(8)-N(9)	-1.8(2)	C(13)-C(13A)-C(14)-C(15)	-179.74(13)
N(3)-C(2)-C(8)-C(15)	-1.1(2)	C(13A)-C(14)-C(15)-C(8)	0.5(2)
N(1)-C(2)-C(8)-C(15)	178.65(13)	N(9)-C(8)-C(15)-C(14)	-1.3(2)
C(8)-N(9)-C(9A)-N(10)	178.48(12)	C(2)-C(8)-C(15)-C(14)	178.25(12)

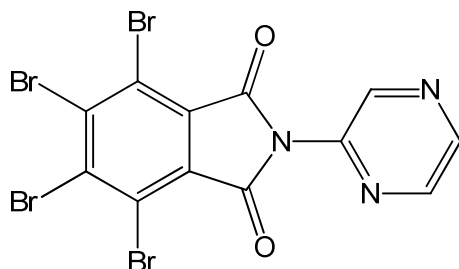
^a Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

7-(1-Methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (57b)

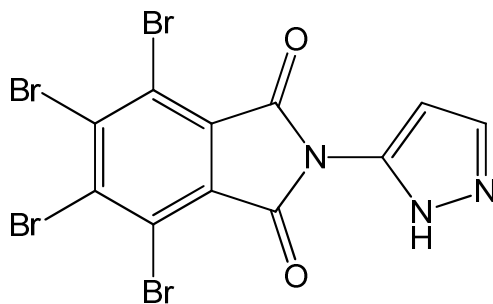
Nach AAV 3 aus 3-(Dimethylamino)-1-(1-methyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)prop-2-en-1-on (**39a**; 229 mg, 1.00 mmol) und 6-Aminouracil (**44b**; 127 mg, 1.00 mmol). Umkristallisation aus DMF/H₂O (7:1) ergab 89.1 mg (30.4%) farbloser Plättchen.

Schmp.: 305-306 °C; IR (KBr): 3390 cm⁻¹ und 3295 cm⁻¹ (NH), 3042 cm⁻¹ und 3011 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2938 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1715 cm⁻¹ und 1692 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 4.32 (s, 3H, N-CH₃), 7.30-7.32 (m, 1H, ArH), 7.37-7.40 (m, 1H, ArH), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.76 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Pyridin-H), 8.39 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Pyridin-H), 11.59 (s, 1H, NH), 11.93 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 33.0 (CH₃); 111.0, 118.4, 119.7, 122.7, 123.8, 137.1 (tert. C); 109.4, 137.3, 141.9, 147.9, 150.5, 151.6, 153.5, 162.0 (quart. C); C₁₅H₁₁N₅O₂ (293.29); ber. C 61.43, H 3.78, N 23.88; gef. C 61.04, H 3.76, N 23.48; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; *t*_N = 3.64 min, *t*_M(DMSO) = 1.03 min (ACN/H₂O; 11:89); λ_{max}: 351 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(pyrazin-2-yl)isoindolin-1,3-dion (**67b**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 464 mg, 1.00 mmol) und Aminopyrazin (**65b**; 95 mg, 1.0 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Reinigung durch Aufkochen in Aceton ergab 61 mg (11%) eines farblosen Pulvers.

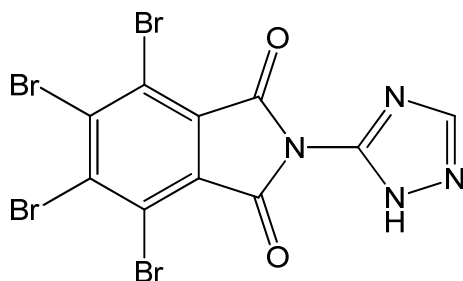
Schmp.: 272-275 °C; IR (KBr): 1716 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 8.81-8.83 (m, 3H, Pyrazin-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 143.6, 144.2, 145.0 (tert. C); 121.1 (2C), 130.8 (2C), 137.0 (2C), 142.2, 162.1 (2C) (quart. C); $\text{C}_{12}\text{H}_3\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_2$ (540.79); ber. C 26.65, H 0.56, N 7.77; gef. C 26.68, H 0.38, N 7.58; HPLC: 98.5 % bei 254 nm und 96.0 % bei 280 nm, t_N = 5.93 min, t_M = 1.06 min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 50:50), λ_{max} : 252 nm und 343 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(1H-pyrazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (**67c**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 466 mg, 1.00 mmol) und 3-Amino-1H-pyrazol (**65c**; 86 mg, 1.03 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Aceton ergab 62 mg (12%) eines farblosen Pulvers.

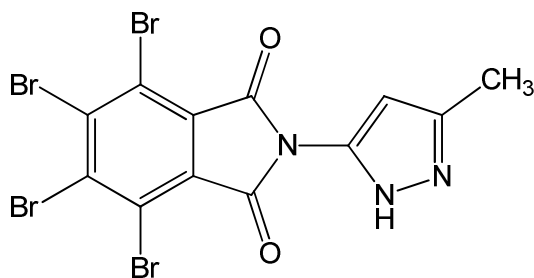
Schmp.: 333-334 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3331 cm^{-1} (NH), 3152 cm^{-1} (CH aromatisch), 1780 cm^{-1} und 1724 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.36 (d, 1H, J = 2.0 Hz, Pyrazol-H), 7.89 (d, 1H, J = 2.0 Hz, Pyrazol-H), 13.18 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 102.5, 130.0 (tert. C); 120.8 (2C), 130.9 (2C), 136.6 (2C), 139.4, 162.5 (2C) (quart. C); $\text{C}_{11}\text{H}_3\text{Br}_4\text{N}_3\text{O}_2$ (528.78); ber. C 24.99, H 0.57, N 7.95; gef. C 24.82, H 0.64, N 7.54; HPLC: 99.6 % bei 254 nm und 99.0 % bei 280 nm, t_N = 4.00 min, t_M = 1.06 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 247 nm und 340 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (**67d**)



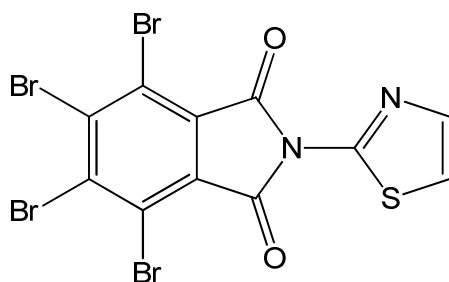
Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 467 mg, 1.01 mmol) und 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (**65d**; 85 mg, 1.0 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Reinigung durch Aufkochen in Aceton ergab 339 mg (64%) eines farblosen Pulvers.

Schmp.: >400 °C; IR (KBr): 3430 cm^{-1} (NH), 2853 cm^{-1} (CH aromatisch), 1784 cm^{-1} und 1736 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 8.79 (s, 1H, Triazol-H), 14.60 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 145.3 (tert. C); 121.2 (2C), 130.7 (2C), 137.0 (2C), 149.6, 162.1 (2C) (quart. C); $\text{C}_{10}\text{H}_2\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_2$ (529.77); ber. C 22.67, H 0.38, N 10.58; gef. C 22.71, H 0.22, N 10.15; HPLC: 98.7 % bei 254 nm und 97.0 % bei 280 nm, t_N = 5.45 min, t_M = 1.06 min (ACN/ H_2O ; 40:60), λ_{max} : 249 nm und 343 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (**67f**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 465 mg, 1.00 mmol) und 5-Methyl-3-amino-1H-pyrazol (**65f**; 98 mg, 1.0 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Aceton ergab 146 mg (27%) eines farblosen Pulvers.

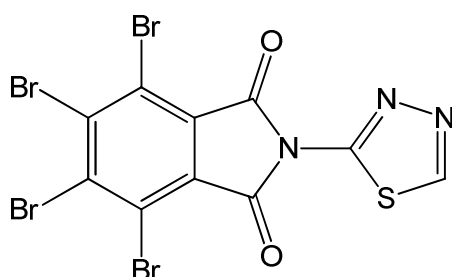
Schmp.: 331-332 °C; IR (KBr): 3443 cm⁻¹, 3255 cm⁻¹ (NH), 3154 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2922 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1778 cm⁻¹ und 1730 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.29 (s, 3H, CH₃), 6.09-6.10 (dd, 1H, *J* = 1.3/0.8, Pyrazol-H), 12.85 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 10.6 (CH₃); 101.5 (tert. C); 120.8 (2C), 130.8 (2C), 136.6 (2C), 139.5, 139.7, 162.5 (2C) (quart. C); C₁₂H₅Br₄N₃O₂ (542.80); ber. C 26.55, H 0.93, N 7.74; gef. C 26.78, H 0.96, N 7.55; HPLC: 99.2 % bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 5.12 min, *t*_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 246 nm und 340 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(thiazol-2-yl)isoindolin-1,3-dion (**67g**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 469 mg, 1.01 mmol) und 2-Aminothiazol (**65g**; 101 mg, 1.01 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Aceton ergab 61 mg (11%) eines farblosen Pulvers.

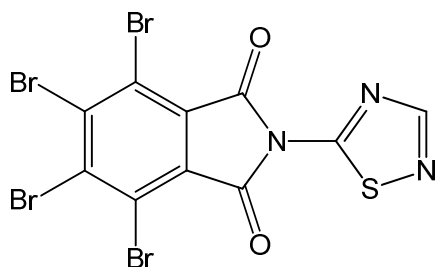
Schmp.: 228-232 °C (Lit.¹⁶⁶: 225-227 °C); IR (KBr): 1784 cm⁻¹ und 1728 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.86 (d, 1H, *J* = 3.6, Thiazol-H), 7.88 (d, 1H, *J* = 3.6, Thiazol-H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 120.8, 140.0 (tert. C); 121.1 (2C), 130.7 (2C), 137.0 (2C), 151.0, 161.0 (2C) (quart. C); C₁₁H₂Br₄N₂O₂S (545.83); ber. C 24.21, H 0.37, N 5.13; gef. C 24.33, H 0.20, N 4.82; HPLC: 98.4 % bei 254 nm und 98.3 % bei 280 nm, *t*_N = 3.97 min, *t*_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 250 nm und 341 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)isoindolin-1,3-dion (**67i**)



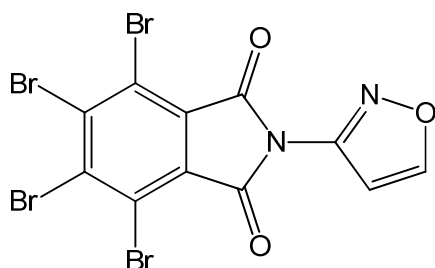
Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 467 mg, 1.01 mmol) und 2-Amino-1,3,4-thiadiazol (**65i**; 103 mg, 1.02 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Umkristallisation aus Aceton ergab 61 mg (11%) eines farblosen Pulvers.

Schmp.: 310-311 °C; IR (KBr): 1784 cm⁻¹ und 1734 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 9.69 (s, 1H, Thiadiazol-H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 154.15 (tert. C); 121.4 (2C), 130.7 (2C), 137.4 (2C), 153.5, 160.4 (2C) (quart. C); C₁₀HBr₄N₃O₂S (546.82); ber. C 21.97, H 0.18, N 7.68; gef. C 22.14, H 0.05, N 7.61; HPLC: 96.6 % bei 254 nm und 96.0 % bei 280 nm, *t*_N = 4.27 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 261 nm und 345 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(1,2,4-thiadiazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (**67j**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 465 mg, 1.00 mmol) und 5-Amino-1,2,4-thiadiazol (**65j**; 101 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Reinigung durch Aufkochen in Aceton ergab 276 mg (51%) eines farblosen Pulvers.

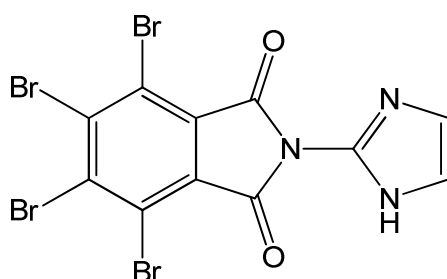
Schmp.: 325-326 °C; IR (KBr): 1733 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 8.84 (s, 1H, Thiazol-H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 159.9 (tert. C); 121.7 (2C), 130.7 (2C), 137.8 (2C), 159.7, 169.9 (2C) (quart. C); C₁₀HBr₄N₃O₂S (546.82); ber. C 21.97, H 0.18, N 7.68; gef. C 22.19, H 0.18, N 7.78; HPLC: 90.0 % bei 254 nm und 93.1 % bei 280 nm, t_N = 3.40 min, t_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 268 nm und 346 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(isoxazol-3-yl)isoindolin-1,3-dion (**67k**)

Nach AAV 4 aus 4,5,6,7-Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 465 mg, 1.00 mmol) und 3-Isoxazolamin (**65k**; 74 µL, 1.0 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Reinigung durch Aufkochen in Aceton ergab 286 mg (54%) eines farblosen Pulvers.

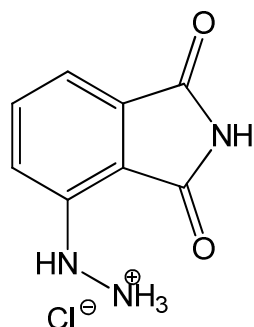
Schmp.: 290-293 °C; IR (KBr): 1741 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.90 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, Isoxazol-H), 9.15 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, Isoxazol-H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 102.2, 161.8 (tert. C); 121.1 (2C), 130.9 (2C), 137.0 (2C), 152.5, 160.9 (2C) (quart. C); C₁₁H₂Br₄N₂O₃ (529.77); ber. C 24.94, H 0.38, N 5.29; gef. C 25.02, H 0.22, N 4.96; HPLC: 99.2 % bei 254 nm und 95.0 % bei 280 nm, t_N = 3.37 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max}: 252 nm und 343 nm.

4,5,6,7-Tetrabrom-2-(1*H*-imidazol-2-yl)isoindolin-1,3-dion (**67I**)



2-Aminoimidazolsulfat (**74**; 132 mg, 0.50 mmol) wurde mit einem definierten Überschuss an DBU (**75**, 23 µL, 1.5 mmol) in Eisessig (10 mL) 5 min gerührt. Anschließend wurde Tetrabromphthalsäureanhydrid (**64**; 1.00 mmol, 464 mg) in Portionen hinzugegeben und der Ansatz für 2-4 h zum Reflux erhitzt. Der nach Abkühlen entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit viel Wasser und wenig Petrolether gewaschen. Nach Soxhlet-Extraktion aus Ethylacetat und anschließender Umkristallisation aus Aceton wurden 122 mg (23%) eines gelben Pulvers erhalten.

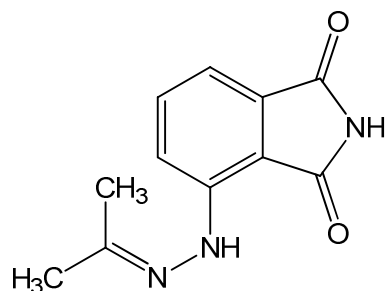
Schmp.: ca. 400 °C; IR (KBr): 3434 cm⁻¹ (NH), 1724 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.04 (s, 1H, ArH), 7.30 (s, 1H, ArH), 12.35 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 118.1, 127.7 (tert. C); 121.2 (2C), 130.4 (2C), 131.2 (2C), 137.3, 162.2 (2C) (quart. C); C₁₁H₃Br₄N₃O₂ (528.78); ber. C 24.99, H 0.57, N 7.95; gef. C 25.32, H 0.60, N 8.24; HPLC: 98.2 % bei 254 nm und 99.0 % bei 280 nm, t_N = 2.93 min, t_M = 1.06 min (ACN/Puffer (pH = 2.6); 45:55), λ_{max}: 246 nm und 343 nm.

2-(1,3-Dioxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**)

3-Aminophthalimid (4-Aminoisindolin-1,3-dion, **77**, 148 mg, 4.00 mmol) wurde in konzentrierter Salzsäure (15 mL) und gestoßenem Eis (10 g) unterhalb von 0 °C (in einer Eis-Natriumchlorid-Wasser-Mischung) gerührt. Zu dieser Suspension wurde unter Beibehaltung der Temperatur vorsichtig tropfenweise eine Lösung von Natriumnitrit (304 mg, 4.40 mmol) in Wasser (3.5 mL) zugefügt. Anschließend wurde 15-30 min gerührt, filtriert und die erhaltene Diazoniumsalzlösung unter kräftigem Rühren auf einmal in eine vorgekühlte Lösung (unter 0 °C) von Zinn(II)chlorid-Dihydrat (1.99 g, 8.80 mmol) in konzentrierter Salzsäure (8 mL) eingebracht. Der Ansatz wurde über Nacht im Gefrierfach aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wurde abgesaugt und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Es wurden 700 mg (82%) eines gelben Pulvers erhalten.

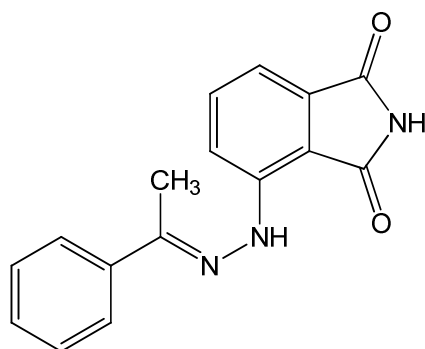
Der Niederschlag enthielt mutmaßlich größere Mengen des Zinn-Doppelsalzes. Auf Grund dessen konnte keine Elementaranalyse angefertigt werden.

Schmp.: 280 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3432 cm⁻¹, 3322 cm⁻¹ und 3171 cm⁻¹ (NH), 3094 cm⁻¹ und 3014 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2924 cm⁻¹ (aliphatisch), 1766 cm⁻¹ und 1705 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm) = 7.31 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.71-7.74 (m, 1H, ArH), 8.54 (s, 1H, Imid-NH), 10.63 (br s, ~3H, NH₃⁺), 11.36 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 114.6, 118.9, 135.6 (tert. C); 114.3, 133.3, 143.1, 168.9, 169.9 (quart. C); C₈H₈ClN₃O₂ (213.62) HPLC: 97.8% bei 254 nm und 95.5% bei 280 nm; t_N = 1.37 min, t_M(DMSO) = 1.03 min (ACN/H₂O; 20:80); λ_{max}: 261 nm.

4-(2-(Propan-2-yliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97a**)

Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 427 mg, 2.00 mmol) und Aceton (**96a**; 220 μ L; 3.00 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Es wurden 329 mg (76%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

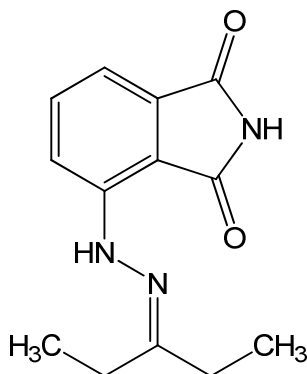
Schmp.: 246-248 $^{\circ}$ C; IR (KBr): 3338 cm^{-1} und 3196 cm^{-1} (NH), 3057 cm^{-1} (CH aromatisch), 1752 cm^{-1} und 1710 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.93 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 7.11-7.12 (dd, 1H, J = 6.7/1.2 Hz, ArH), 7.59-7.63 (m, 2H, ArH), 9.14 (s, 1H, Imid-NH), 11.17 (s, 1H, Hydrazon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 15.6, 24.8 (CH₃); 112.3, 117.3, 135.9 (tert. C); 110.5, 133.0, 143.1, 148.5, 169.2, 171.1 (quart. C); C₁₁H₁₁N₃O₂ (217.22).

4-(2-(1-Phenylethyliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97b**)

Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 320 mg, 1.50 mmol) und Acetophenon (**96b**; 230 μ L, 2.00 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Es wurden 305 mg (73%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

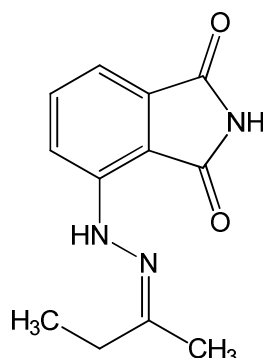
Schmp.: 245-244 °C; IR (KBr): 3326 cm^{-1} und 3181 cm^{-1} (NH), 3052 cm^{-1} (CH aromatisch), 1754 cm^{-1} und 1708 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.31 (s, 3H, CH_3), 7.19-7.21 (dd, 1H, $J = 7.1/0.6$ Hz, ArH), 7.37-7.46 (m, 3H, ArH), 7.68-7.71 (dd, 1H, $J = 7.2/1.2$ Hz, ArH), 7.82 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.85-7.88 (m, 2H, ArH), 9.56 (s, 1H, Imid-NH), 11.25 (s, 1H, Hydrazon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 12.0 (CH_3); 113.1, 117.7, 125.7 (2C), 128.4 (2C), 128.6, 136.0 (tert. C); 111.6, 133.1, 137.9, 142.7, 145.7, 169.2, 171.1 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (279.29).

4-(2-(Pentan-3-yliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97c**)



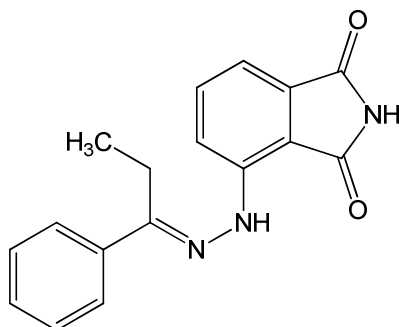
Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 430 mg, 2.01 mmol) und Pentan-3-on (**96c**; 320 μL , 3.00 mmol). Reaktionsdauer: 32 h. Es wurden 292 mg (60%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

Schmp.: 180-182 °C; IR (KBr): 3340 cm^{-1} und 3214 cm^{-1} (NH), 3059 cm^{-1} (CH aromatisch), 2974 cm^{-1} (aliphatisch), 1755 cm^{-1} und 1735 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.09-1.15 (m, 6H, 2x CH_3), 2.29-2.37 (m, 4H, 2x CH_2), 7.10-7.12 (dd, 1H, $J = 5.7/2.3$ Hz, ArH), 7.60-7.65 (m, 2H, ArH), 9.33 (s, 1H, Imid-NH), 11.15 (s, 1H, Hydrazon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.0, 10.5 (CH_3); 21.7, 28.9 (sek. C); 112.1, 117.1, 135.7 (tert. C); 110.6, 133.0, 143.3, 156.1, 169.3, 171.3 (quart. C); $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (245.28).

4-(2-(Butan-2-yliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (97d)

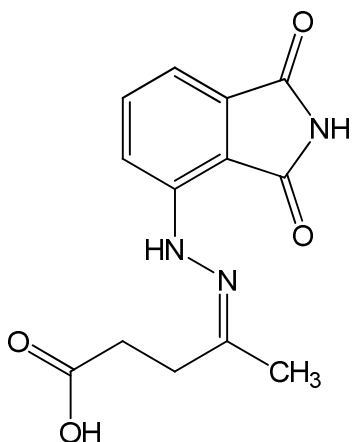
Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 428 mg, 2.00 mmol) und Butan-2-on (**96d**; 20 μ L, 3.0 mmol). Reaktionsdauer: 24 h. Es wurden 339 mg (73%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

Schmp.: 179-181 $^{\circ}$ C; IR (KBr): 3337 cm^{-1} und 3214 cm^{-1} (NH), 2977 cm^{-1} (aliphatisch), 1760 cm^{-1} und 1709 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.10 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH_3), 1.91 (s, 3H, J = 7.4 Hz, CH_3), 2.33 (q, 2H, CH_2), 7.10-7.12 (dd, 1H, J = 5.7/2.0 Hz, ArH), 7.59-7.63 (m, 2H, ArH), 9.14 (s, 1H, Imid-NH), 11.14 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 10.6, 14.4 (prim. C); 31.3 (sek. C); 112.3, 117.4, 135.9 (tert. C); 110.6, 133.0, 1, 143.3, 152.1, 169.3, 171.1 (quart. C); $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (231.25).

4-(2-(1-Phenylpropyliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97e**)

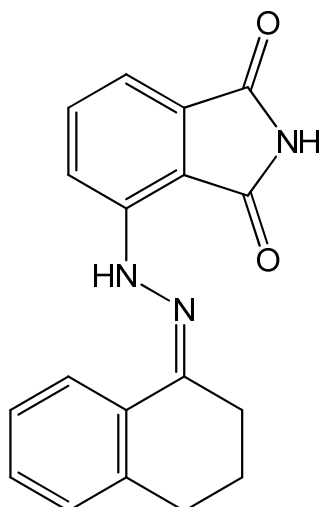
Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 427 mg, 2.00 mmol) und Propiophenon (**96e**; 403 μ L, 3.00 mmol). Reaktionsdauer: 14 h. Es wurden 487 mg (84%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

Schmp.: 195-197 °C; IR (KBr): 3425 cm^{-1} und 3201 cm^{-1} (NH), 3058 cm^{-1} (CH aromatisch), 2967 cm^{-1} (aliphatisch), 1758 cm^{-1} und 1716 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.21 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH_3), 2.80 (q, 2H, J = 7.8 Hz, CH_2), 7.19-7.21 (dd, 1H, J = 7.0/0.8 Hz, ArH), 7.37-7.47 (m, 3H, ArH), 7.68-7.72 (dd, 1H, J = 7.3/1.1 Hz, ArH), 7.82 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 7.86-7.88 (m, 2H, ArH), 9.75 (s, 1H, Imid-NH), 11.25 (s, 1H, Hydrazon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 9.6 (CH_3); 18.7 (sek. C); 113.2, 117.7, 125.6 (2C), 128.5 (2C), 128.6, 136.0 (tert. C); 11.7, 133.0, 136.8, 142.7, 149.9, 169.3, 171.3 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (293.32).

4-(2-(1,3-Dioxoisindolin-4-yl)hydrazonyl)pentansäure (97f)

Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 427 mg, 2.00 mmol) und Lävulinsäure (**96f**; 307 μ L, 3.00 mmol). Reaktionsdauer: 16 h. Es wurden 451 mg (82%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

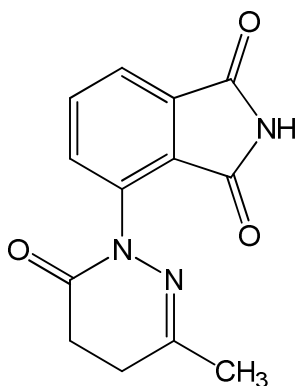
Schmp.: 297-298 °C; IR (KBr): 3332 cm^{-1} und 3241 cm^{-1} (NH), 2916 cm^{-1} (aliphatisch), 1763 cm^{-1} und 1714 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.52-2.54 (m, 2H, CH_2), 2.56-2.58 (m, 2H, CH_2), 7.12-7.13 (dd, 1H, $J = 5.4/2.6$ Hz, ArH), 7.62-7.63 (m, 2H, ArH), 9.18 (s, 1H, Imid-NH), 11.18 (s, 1H, Hydrazon-NH), 12.10 (s, 1H, COOH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 15.0 (CH_3); 29.9, 32.9 (sek. C); 112.4, 117.5, 135.8 (tert. C); 110.6, 132.9, 143.2, 149.5, 169.2, 171.1, 174.0 (quart. C); $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$ (275.26).

4-(2-(3,4-Dihydronaphthalen-1(2H)-yliden)hydrazinyl)isoindolin-1,3-dion (**97g**)

Nach AAV 5 aus 2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**81**; 214 mg, 1.00 mmol) und α -Tetralon (**96g**; 200 μ L, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Es wurden 233 mg (76%) eines gelben Pulvers erhalten, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wurde.

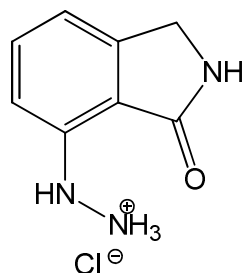
Schmp.: 294-296 °C; IR (KBr): 3333 cm^{-1} und 3186 cm^{-1} (NH), 3056 cm^{-1} (CH aromatisch), 2946 cm^{-1} (aliphatisch), 1755 cm^{-1} und 1704 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.93 (quint, 2H, J = 6.2 Hz, CH_2), 2.67 (t, 2H, J = 6.7 Hz, CH_2), 2.76 (t, 2H, J = 6.1 Hz, CH_2), 7.19-7.20 (dd, 1H, J = 7.2/0.7 Hz, ArH), teilweise überlagert 7.20-7.21 (m, 1H, ArH), 7.26-7.28 (m, 2H, ArH), 7.69-7.71 (dd, 1H, J = 7.0/1.3 Hz, ArH), 7.85 (d, 1H, J = 8 Hz, ArH), 8.10-8.13 (m, 1H, ArH), 9.56 (s, 1H, Imid-NH), 11.25 (s, 1H, Hydrazon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.1, 24.0, 28.7 (sek. C); 113.0, 117.6, 123.9, 126.3, 128.4 (2C), 136.0 (tert. C); 111.4, 132.3, 133.0, 139.1, 142.6, 145.5, 169.2, 171.1 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (305.33).

4-(3-Methyl-6-oxo-5,6-dihydropyridazin-1(4*H*)-yl)isoindolin-1,3-dion (**100**)



Nach AAV 6 aus 4-(2-(1,3-Dioxoisoindolin-4-yl)hydrazonyl)pentansäure (**97f**; 82.6 mg, 0.25 mmol) und Polyphosphorsäure (2.4 g). Reaktionsdauer: 10 h. Es wurden 38 mg (49%) eines weißen Pulvers erhalten.

Schmp.: 219-221 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.04 (s, 3H, CH_3), 2.56-2.59 (m, Teil eines AA'BB'-Systems, 2H, CH_2), 2.64-2.66 (m, Teil eines AA'BB'-Systems, 2H, CH_2), 7.73 (dd, 1H, $J = 1.1/8.0$ Hz, ArH), 7.79 (dd, 1H, $J = 1.1/8.0$ Hz, ArH), 7.86-7.89 (m, 1H, ArH), 11.34 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 22.6 (CH_3); 26.0, 26.6 (sek. C); 121.8, 132.9, 135.4 (tert. C); 126.7, 133.3, 137.3, 155.6, 165.4, 167.0, 168.5 (quart. C); $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ (257.25).

2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**102**)

7-Aminoisindolin-1-on (**101**; 148 mg, 1.00 mmol) wurde in einem Gemisch aus konzentrierter Salzsäure (6 mL) und gestoßenem Eis (8 g) unterhalb von 0 °C (in einer Eis-Natriumchlorid-Wasser-Mischung) gerührt. Zu dieser Suspension wurde unter Beibehaltung der Temperatur vorsichtig tropfenweise eine Lösung von Natriumnitrit (76 mg, 1.1 mmol) in Wasser (2.5 mL) zugefügt. Anschließend wurde 15-30 min gerührt, filtriert und die erhaltene Diazoniumsalzlösung unter kräftigem Rühren auf einmal in eine vorgekühlte Lösung von Zinn(II)chlorid-Dihydrat (542 mg, 2.40 mmol) in konzentrierter Salzsäure (6 mL) eingebracht. Der Ansatz wurde über Nacht im Gefrierfach aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wurde abgesaugt, mit einem Gemisch aus Petrolether und Diethylether (2:1) gewaschen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Es wurden 297 mg (148%) eines gelben Pulvers erhalten.

Der Niederschlag enthält mutmaßlich größere Mengen des Zinn-Doppelsalzes. Auf Grund dessen konnte keine Elementaranalyse angefertigt werden.

Schmp.: 238-239 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.05 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.14 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 8.07 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 8.54 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 9.05 (s, 1H, NH), 10.46 (br s, ~3H, NH_3^+); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 45.7 (sek. C); 113.3, 116.4, 132.9 (tert. C); 117.5, 143.5, 146.1, 171.1 (quart. C); $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ (199.64).

Anhang zu Kapitel 7.2: Gefahrstoffverzeichnis

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe sind unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsmaßnahmen (H- und P-Sätze, *hazard and precautionary statements*) zu handhaben. Bei den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind bei der Verwendung besondere Gefahren zu beachten.

Anilin und seine Derivate

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS08, GHS05, GHS09.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H351-341-331-311-301-372-318-317-400:

Kann vermutlich Krebs erzeugen. - Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. - Giftig bei Einatmen. - Giftig bei Hautkontakt. - Giftig bei Verschlucken. - Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. - Verursacht schwere Augenschäden. - Kann allergische Hautreaktionen verursachen. - Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P273-280-308+313-302+352-305+351+338-309+310:

Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. - Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. - Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. - Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. - Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Diethylether

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07.

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H224-302-336-EUH019-066:

Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar. - Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. - Kann explosionsfähige Peroxide bilden. - Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

Sicherheitshinweise: P210-261:

Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. – Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

***N,N*-Dimethylformamid**

Gefahrenpiktogramm: GHS02, GHS08, GHS07.

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H360D-226-332-312-319:

Kann das Kind im Mutterleib schädigen. - Flüssigkeit und Dampf entzündbar. - Gesundheitsschädlich bei Einatmen. - Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. Verursacht schwere Augenreizung.

Sicherheitshinweise: P302+352-305+351+338-308+313:

Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. - Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. - Bei Explosion oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

Natrium

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H260-314-EUH014:

In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können. - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. - Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P280-301+330+331-305+351+338-309+310-370+378-422:

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. - Bei Verschlucken: Mund ausspülen. - Kein Erbrechen herbeiführen. - Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. - Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. - Bei Brand: Metallbrandpulver zum Löschen verwenden. - Inhalt unter Schutzflüssigkeit aufbewahren.

Phenylhydrazin und seine Derivate

Gefahrenpiktogramme: GHS08, GHS06, GHS09.

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H350-341-331-311-301-372-319-315-317-400:

Kann Krebs erzeugen. - Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. - Giftig bei Einatmen. - Giftig bei Hautkontakt. - Giftig bei Verschlucken. - Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. - Verursacht schwere Augenreizung. - Verursacht Hautreizungen. - Kann allergische Hautreaktionen verursachen. - Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P201-281-273-304+340-302+310:

Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. - Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. - Bei Einatmen an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. - Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

7.3 Biologische Daten

7.3.1 Proteinkinase-Assay (ProQinase)

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Anilinopyrimidine **31** und Pyridopyrimidine **57** wurden in einem *in vitro*-Proteinkinase-Assay auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität von der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, getestet.

Die IC₅₀-Profile wurden gegenüber tumorrelevanten Proteinkinasen (AKT1, ALK, ARK5, Aurora B, AXL, B-RAF-V600E, CK2- α 1, FAK, IGF1-R, MEK, MET, NEK2, NEK6, PLK1, PIM1, PRK1, SAK, SRC, TRK-B, VEGF-R2) sowie an der physiologisch essentiellen Insulin-Rezeptor-Kinase (INS-R) ermittelt.

Die verwendeten Proteinkinasen wurden in Sf9-Insektenzellen oder in E.coli als humane rekombinante GST-Fusionproteine oder als (His)₆-markierte Proteine exprimiert. Durch anschließende Affinitätschromatographie an GSH-Agarose (Sigma) oder an Ni-NTH-Agarose (Qiagen) wurden die Kinasen isoliert und gereinigt. Die Reinheit der einzelnen Kinasen wurde mittels SDS-Page/Silberfärbung kontrolliert und die Identität mittels Massenspektrometrie verifiziert. Die Kinase-Aktivität wurde mit dem radiometrischen ³³PanQinase® Activity Assay gemessen. Dabei wurde die Phosphorylierungsaktivität der Enzyme gegenüber den entsprechenden Substraten unter Verwendung von radioaktiv markiertem [γ -³³P]-ATP bestimmt. Gemessen wurde das an das Substrat gebundene γ -³³P.

In 96-Well FlashPlates™ der Firma Perkin Elmer/NEN (Boston, MA, USA) wurden die Kinase-Assays in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die einzelnen Komponenten der Reaktionsmischung wurden in der folgenden Reihe pipettiert:

- 20 μ l Standardpuffer
- 5 μ l ATP-Lösung (in H₂O)
- 5 μ l Probelösung (in 10% DMSO)
- 20 μ l einer Mischung aus je 10 μ l Substrat- und Enzym-Lösung

Der Assay für alle Enzyme enthielt 60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-orthovanadat, 1.2 mM DTT, 50 μ M PEG₂₀₀₀₀, 1 μ M [γ -³³P]-ATP (ca. 5 x 10⁵ bzw. 8 x 10⁵ cpm/Well).

Die verwendeten Enzym- und Substratkonzentrationen pro Well der untersuchten Kinasen sind in Tabelle 7-7 gelistet.

Tabelle 7-7: Kinase- und Substratkonzentrationen des ³³PanQinase® Activity Assay

Kinase	Kinase c [ng/50 µl]	Substrat	Substrat c [ng/50 µl]
AKT1	50/25	GSK3 (14-21)	1000/2000
ARK5	100	RBER-CHKtide	1000/2000
Aurora B	100	tetra(LRRWSLG)	500
B-RAF-VE	20	MEK1-KM, Lot 021	250
INS-R	25	Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr) _{6:2:5:1}	125
MET	100/20	Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr) _{6:2:5:1}	125
PLK1	30/15	RBER-CHKtide (PR080711)	2000
PRK1	200/25	Histon H2B/ RBER-CHKtide	250/2000
SAK	100	P38-alpha KA, Lot 001	2000
TRK-B	10	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
CK2-α1	50	Casein	1000
AXL	50/25	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125/250
FAK	200/25	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
IGF1-R	20/10	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
SRC	10	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
VEGF-R2	50/25	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
NEK6	20	GSK3 (14-21)	2000
PIM1	3	GSK3 (14-21)	2000
ALK	10	Poly(Glu,Tyr) _{4:1}	125
NEK2	100	RB-CTF	1000
MEK1	50	ERK2-KR	2000

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 2%igen (v/v) Phosphorsäure gestoppt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend zweimal mit 200 µl einer 0.9%igen (w/v) Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Gebundenes ³³P_i an das entsprechende Substrat wurde mit einem Mikroplatten-Szintillationszähler (Microbeta Trilux, Wallac) bestimmt. Alle Assays

wurden mit einem Beckman Coulter/Sagian-Roboter System bzw. einem Beckman Coulter Core-Roboter System durchgeführt.

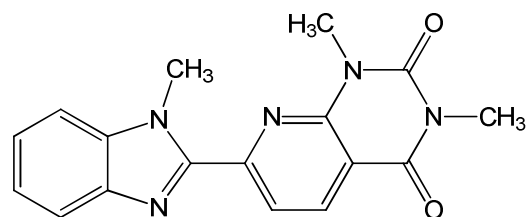
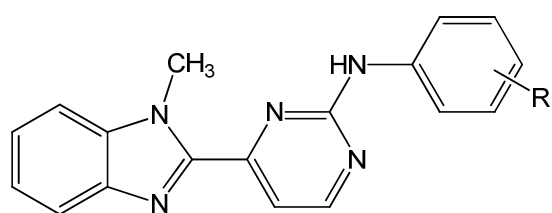
Zur Ermittlung der Restaktivitäten der Proteinkinasen wurde die 100% Kinaseaktivität bestimmt. Diese wurde erhalten durch die Bestimmung von zwei Werten, die *high control* sowie die *low control*. Die *high control* beschreibt die uneingeschränkte Enzymaktivität und wurde mit Kontrollproben erhalten, die keinen Inhibitor, aber Substrat und Enzym enthalten. Die *low control* stellt die unspezifische Bindung von radioaktivem Material an die Mikrotiterplatte dar. Die Proben enthalten nur Substrat, aber weder Enzym noch Inhibitor. Die Differenz von *high control* und *low control* ergibt die reine Enzymaktivität und wird mit 100% gleichgesetzt. Danach errechnet sich die Restaktivität nach folgender Gleichung:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100 \%$$

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden von jeweils 10 Inhibitor-Konzentrationen die Restaktivitäten im Bereich von 100 µM bis 3 nM gemessen. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit dem Programm Quattro Workflow V3.0.6 (Quattro Research GmbH, München).

Die Assay-Qualität wurde durch die Bestimmung des Z'-Faktors der Kontrollproben (*low control* und *high control*) jeder Mikrotiterplatte (n = 8) ermittelt.¹⁶⁷ Bei Z'-Faktoren <0.4 muss das Assay wiederholt werden. Alle Z'-Faktoren der durchgeführten Messungen befanden sich oberhalb von 0.5, so dass von einer guten bis exzellenten Assay-Qualität ausgegangen werden kann.

Nachfolgend sind die IC₅₀-Werte aller getesteten Verbindungen dargestellt (Tabelle 7-8).

Tabelle 7-8: IC₅₀-Werte [μM] von **31** und **57a** an 21 Kinasen^{a,b}

	R		R
31a	3-, 4-H	31f	3-H, 4-OCH ₃
31b	3-H, 4-CH ₃	31g	3-H, 4-OH
31c	3-H, 4-Cl	31h	3-OH, 4-H
31d	3-H, 4-Morpholin-1-yl	31i	3-Cl, 4-OH
31e	3-H, 4-OC ₂ H ₅	31j	3-OH, 4-OCH ₃

	31a	31b	31c	31d	31e	31f
AKT1	>100	>100	41	>100	>100	95/54
ALK	28	98	>100	>100		37
ARK5	>100	>100	>100	>100	>100	79/50
Aurora B	>100	>100	>100	>100	>100	87/37
AXL	30/32	>100	>100	>100	>100	>100
B-RAF VE	24				>100	26
CK2-α1	>100				>100	>100
FAK	44/32	58	69	24	>100	37/17
IGF1-R	9.8/23	36	27	>100	>100	42/23
INS-R	>100				>100	92
MET	75	>100	>100	>100	>100	>100
MEK1	>100	>100	>100	>100		>100
NEK2	65	>100	>100	>100		36
NEK6	>100	>100	>100	>100		49
PLK1	39/80	>100	>100	>100	>100	15/14
PIM1	80	>100	>100	>100		43
PRK1	29/40	>100	>100	>100	>100	63/27
SAK	38				>100	39
SRC	14/18	12	11	>100	>100	20
TRK-B	6.2				>100	90
VEGF-R2	9.7/17	25	38	69	>100	62/25

^a Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

^b Fehlende Werte sind nicht verfügbar.

Tabelle 7-8: IC₅₀-Werte [μ M] von **31** und **57a** an 21 Kinasen (Fortsetzung)^{a,b}

	31g	31h	31i	31j	57a
AKT1	>100	>100	>100	>100	>100
ALK	18	22	14	30	
ARK5	>100	21	33/26	49/21	>100
Aurora B	8.2/14	5.6/5.3	4.7/9.3	5.8/6.2	>100
AXL	32	45/60	29/45	36	>100
B-RAF VE	14	8.0	4.4	>100	>100
CK2-α1	>100	93	>100	>100	>100
FAK	7.8/15	4.1/6.3	7.7/13	2.6/4.1	92
IGF1-R	19/26	67	11/19	76/36	94
INS-R	>100	15	31	>100	>100
MET	38	>100	99/63	>100	>100
MEK1	>100	>100	>100	>100	
NEK2	94	37	26	12	
NEK6	61	52	18	10	
PLK1	13/11	4.3/3.3	6.0/5.9	1.4/1.0	>100
PIM1	82	95	87/28	>100	
PRK1	56/99	>100	40	>100	>100
SAK	30	17	9.7	12	>100
SRC	23/42	54/27	11/13	37/31	85
TRK-B	8.1	7.1	3.8	14	40
VEGF-R2	7.3/11	3.2/3.2	5.5/9.4	7.4/6.9	85

^a Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

^b Fehlende Werte sind nicht verfügbar.

7.3.2 Kinaseassay mit Casein Kinase 2

Literaturbekannte Tetrabromisoindole sind potente selektive CK2-Inhibitoren.^{32, 96, 152} Daher wurden die synthetisierten Tetrabromisoindole **67** von der Arbeitsgruppe um L. Pinna (Universität Padua, Italien) auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber der Casein Kinase 2 untersucht.

Das Holoenzym CK2 wurde aus Rattenleber extrahiert und gereinigt. Die Messung der Kinaseaktivität zur Bestimmung der IC₅₀-Werte der zu testenden Substanzen erfolgte in einem Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 12 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl) mit 100 µM synthetischem Protein (RRRADDSDDDDD; Dr. Marin, CRIBI, Padova), spezifisch für CK2-Testungen sowie 20 µM ATP (mit einem Anteil radioaktiv markiertem [γ-³³P]-ATP) in einem Endvolumen von 25 µL. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung auf Eis gegeben, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Anschließend wurde die Lösung auf Phosphocellulose-Papier gegeben und mit 0.5% Phosphorsäure (pH 2) dreimal für 10 Minuten gewaschen. Die nassen Papiere wurden anschließend mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit (Amersham) versetzt und die Radioaktivitäten, die sich proportional zum inkorporierten Phosphat verhalten, vermessen. Von allen Inhibitoren wurde eine 10 mM DMSO-Lösung angefertigt, die als Stammlösung fungierte. Von dieser wurden für die jeweiligen Messungen Verdünnungen des Inhibitors in DMSO hergestellt.

Die Ergebnisse des Kinaseassays finden sich im Biologischen Teil, Kapitel 4.2.1.

7.3.3 In vitro Assay mit CDKs, CLKs und verwandten Kinasen

Indirubine sind potente Inhibitoren, die selektiv Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) sowie Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) hemmen. Daher wurden die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Mini-Indirubine **36**, **37** und **101** von der Arbeitsgruppe um L. Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) auf ihre kinase-inhibitorische Aktivität gegenüber CDKs, GSK-3 und verwandten Kinasen untersucht.

In einem *in vitro*-Assay wurde die prozentuale Restaktivität von CDK/Cyclin-Komplexen (CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, CDK5/p25, CDK9/Cyclin T), CK1, CLK1-4, DYRK1A, 1B, 2 und 3, GSK-3 α , β und Pim1 bestimmt. Die Expression und Reinigung der isolierten Enzyme wird im Folgenden näher erläutert. Die jeweiligen Proteinsubstrate wurden von Millegen (Labège, Frankreich) erhalten.

Die Verbindungen **36d**, **e**, **37c-e**, **g-l** und **101** wurden als Lösungen in DMSO (1%ige finale Konzentration) eingesetzt. In Gegenwart von radioaktiv markiertem [γ -³³P]-ATP wurden die Radioaktivitäten der Substrate bestimmt, die sich proportional zum inkorporierten Phosphat verhalten. In Dreifachbestimmungen wurde die Restaktivität der jeweiligen Proteinkinase bei 10 μ M ermittelt. Es wurde eine Negativkontrolle ohne Enzym und eine Positivkontrolle ohne Zusatz von Inhibitor angefertigt. Nach Abzug der Blindwerte wurde die Kinaseaktivität prozentual zur maximalen Enzymaktivität (Positivkontrolle) angegeben.

Von Verbindungen **36e** und **101** wurden die IC₅₀-Werte gegenüber den Kinasen CDK5, CK1, GSK-3 und DYRK1A bestimmt. Dazu wurde in Dreifachmessungen bei neun verschiedenen Inhibitorkonzentrationen die Restaktivität der jeweiligen Kinase gemessen. Pro Verdünnungsreihe wurden Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Nach Abzug der Negativkontrolle wurde die Kinaseaktivität prozentual zur maximalen Enzymaktivität (Positivkontrolle) berechnet. Anschließend wurde die Substanzkonzentration in logarithmischer Form gegen die entsprechende prozentuale Restaktivität aufgetragen. Aus den entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die IC₅₀-Werte bei 50%iger Aktivität bestimmt.¹⁶⁸ Die Ergebnisse finden sich im Biologischen Teil, Kapitel 4.3.1.

CDK1/Cyclin B

Der CDK1/Cyclin B-Komplex wurde aus in der M-Phase befindlichen Oocyten des Seesterns *Marthasterias glacialis* extrahiert. Die Reinigung und Isolierung des Enzyms erfolgte durch Affinitätschromatographie an p9^{CKShs1}-Sephrose-Kügelchen. Das gebundene Enzym wurde mit freiem p9^{CKShs1} eluiert.^{50, 169} Die Kinaseaktivität wurde in Kinasepuffer C (60 mM β -Glycerophosphat, 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 25 mM Mops (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, pH 7.2), 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Phenylphosphat) mit 1 mg/mL Histon H1 als Substrat und 15 μ M [γ -³³P]-ATP [3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL] in einem Gesamtvolumen von 30 μ l bestimmt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Lösung auf Whatman P81 Phosphocellulose-Papier gegeben, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Die Filter wurden mit 1%iger Phosphorsäure (v/v) gewaschen und in Gegenwart von 1 mL ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität gemessen.¹⁷⁰

CDK2/Cyclin A

CDK2/Cyclin A wurde aus gleichen Anteilen rekombinanter Säuger-CDK2 und Cyclin A hergestellt. Der Komplex wurde durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert und gereinigt.¹⁷¹ Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B.¹⁶⁹

CDK5/p25

Dieser Komplex wurde aus rekombinanter Säuger-CDK5 und Protein p25 zu gleichen Anteilen hergestellt. Das Protein p25 (verkürzte Version von p35, dem 35kDa schweren, regulatorischen Protein der CDK5) wurde in *E.coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/CyclinB.^{50, 169,}

170

CDK9/Cyclin T

Die humane rekombinante Proteinkinase CDK9/Cyclin T wurde in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert. Die Bestimmung der Kinaseaktivität folgt ähnlich der Beschreibung von CDK1/Cyclin B mit dem Unterschied, dass als Substrat ein pRB-Fragment (Aminosäuren 773-928; 3.5 µg/Assay) verwendet wurde.¹⁷⁰

CK1

Die Proteinkinase CK1 wurde aus homogenisiertem Schweinehirn isoliert. Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie an Agarose mit immobilisiertem GST-Axin.¹⁷² Die Kinaseaktivität wurde analog zu CDK1/Cyclin B, in dreifach verdünntem Kinasepuffer C und in Gegenwart von 25 µM eines CK1-spezifischen Substrats (RRKHAAIGpSAYSITA) bestimmt.¹⁷⁰

Pim 1

Pim 1 wurde in *E.coli* als humanes, rekombinantes GST-Fusionprotein exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose und die Kinaseaktivität wurde analog zu CDK1/Cyclin B bestimmt.¹⁷⁰

GSK-3α/β

GSK-3α/β (GSK-3α human; GSK-3β, rekombinant) wurden aus Schweinehirn über Affinitätschromatographie mit an Agarose immobilisiertem Axin-(His)₆ isoliert und gereinigt.^{50, 173} Die Kinaseaktivität wurde in Kinasepuffer A (10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) und 50 µg Heparin/mL) mit 40 µM GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE; pS steht für phosphoryliertes Serin) als Substrat und 15 µM [γ-³³P]-ATP in einem finalen Volumen von 30 µL bestimmt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Lösung auf Whatman P81 Phosphocellulose-Papier gegeben, mit 1%iger Phosphorsäure (v/v) gewaschen und in Gegenwart einer Szintillationsflüssigkeit vermessen.¹⁷⁰

DYRK1A, 1B, 2, 3

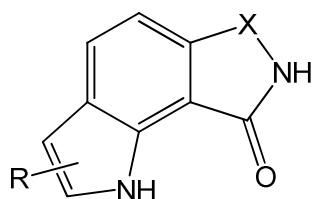
Aus der Ratte stammende DYRK1A und humane DYRK1A sowie DYRK1B, 2 und 3 wurden in *E.coli* als rekombinante GST-Fusionproteine exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu GSK-3 α/β unter Zusatz von 0.5 mg BSA/mL und unter Verwendung von Woodtide (KKISGRLSPIMTEQ; 1.5 μ g/Assay) als Substrat.¹⁷⁰

Native DYRK1A wurde aus dem Gehirn der Ratte isoliert und mit Hilfe der natürlich vorkommenden Poly-Histidin-Sequenz auf der C-terminalen Domäne von DYRK1A durch Affinitätschromatographie an Cobalt-Sepharose-Kügelchen (Clontech) gereinigt. Die Kinaseaktivität wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Humane DYRK1A wurde auch in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert. Unter Verwendung eines Vektorplasmids (pGTP-B-302) wurde das DYRK1A-Gen in Sf9-Zellen als (His)₆-*tagged* Fusionsprotein exprimiert. Die extrahierten Proteine wurden über Affinitätschromatographie Ni-NTA gereinigt und mit Imidazol eluiert.

CLKs (1-4)

Die murinen, rekombinanten CLKs (1-4) wurden in *E.coli* als Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte unter Verwendung des Kinasepuffers A mit 0.15 mg BSA/mL-Zusatz in Gegenwart von RS-Protein (GRSRSRSRSRSR, 1 μ g/Assay) als Substrat.¹⁷⁰

Tabelle 7-9: Restaktivität [%] der Kinasen in Gegenwart von **36** und **37** [10 µM]^a**36d** X: C=O**37** X: CH₂

Verbindung	R		Verbindung	R	
36d	2-CH ₃	3-CH ₃	37h	2-Ph	3-C ₂ H ₅
37c	2-C ₂ H ₅	3-CH ₃	37i	2-(4-H ₃ C-Ph)	3-CH ₃
37d	2-CH ₃	3-CH ₃	37j	2-(4-H ₃ CO-Ph)	3-CH ₃
37e	2-Ph	3-CH ₃	37k	2-(4-Cl-Ph)	3-CH ₃
37g			37l	2-(3-F ₃ C-Ph)	3-CH ₃

	36d	37c	37d	37e	37g
CDK1/Cyclin B	81±27	94±13	93±26	77±26	60±24
CDK2/Cyclin A	108±8	99±8	103±2	109±8	98±4
CDK5/p25	94±4	100±9	111±18	105±11	111±15
CDK9/Cyclin T	90±5	93±5	104±7	89±6	91±10
CK1	65±5	50±6	75±3	57±5	69±4
CLK1	52±10	20±2	92±8	29±4	42±3
CLK2	33±7	31±4	63±17	30±1	28±19
CLK3	91±11	92±12	104±14	93±9	95±5
CLK4	21±1	7±2	48±6	10±0	23±2
GSK-3α/β	51±5	97±3	135±18	112±2	116±19
DYRK1A	41±8	54±1	82±5	58±7	64±15
DYRK1B	39±5	46±8	77±11	50±5	61±9
DYRK2	20±5	42±12	61±4	57±25	24±5
DYRK3	57±3	65±9	89±8	91±17	86±8
Pim1	58±9	95±17	106±14	117±27	106±18

^a Werte mit Standardabweichung repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Testreihen.

Tabelle 7-9: Restaktivität [%] der Kinasen in Gegenwart von **36** und **37** [10 µM]
(Fortsetzung)^a

	37h	37i	37j	37k	37l
CDK1/Cyclin B	109±30	100±20	123±6	128±18	100±5
CDK2/Cyclin A	104±2	102±9	104±2	105±7	102±23
CDK5/p25	112±11	114±11	111±4	111±7	110±17
CDK9/Cyclin T	100±10	101±3	89±10	104±12	94±8
CK1	86±3	84±7	100±4	89±8	93±8
CLK1	66±3	105±12	124±19	110±13	119±11
CLK2	66±5	77±6	86±5	88±6	87±8
CLK3	110±16	105±10	98±10	106±6	97±9
CLK4	38±3	64±9	81±9	68±6	79±10
GSK-3α/β	111±7	120±31	127±13	128±28	129±18
DYRK1A	74±14	99±16	101±11	98±8	105±5
DYRK1B	65±8	85±7	89±16	81±9	76±11
DYRK2	50±6	75±11	77±18	72±14	77±15
DYRK3	87±5	92±9	107±22	98±8	98±9
Pim1	113±31	103±13	109±14	123±16	107±10

^a Werte mit Standardabweichung repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Testreihen.

7.3.4 Tumorzelllinien-Screening

Die Verbindungen **31j**, **67g** und **67l** wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität untersucht. Der Assay umfasst insgesamt ca. 60 verschiedene humane Tumorzelllinien, die neun verschiedene Krebsformen repräsentieren. Dazu gehören nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Ovarial-, Brust-, Darm-, Nieren- und Prostatakrebs sowie Krebs des zentralen Nervensystems, Leukämie und Melanome.¹⁴⁵

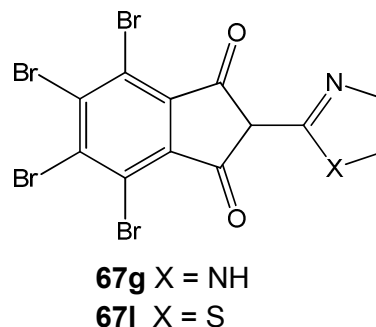
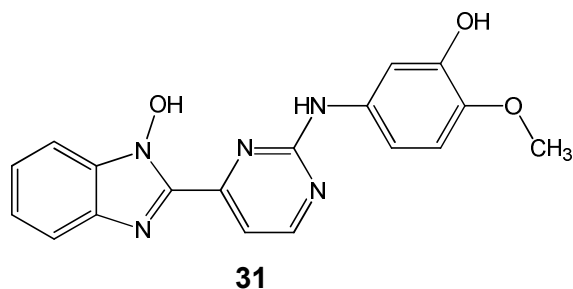
Die Tumorzelllinien wurden unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin in 5%igem Kälberserum-enthaltendem RPMI 1640 Medium kultiviert. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden 100 µL/Well mit Zellen beimpft. In Abhängigkeit der Wachstums-eigenschaften der Zelllinie wurde pro Well eine Zelldichte zwischen 5 000 und 40 000 Zellen erreicht. Für das Screening wurden die Mikrotiterplatten 24 h bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit gelöster Substanz versetzt. Nach weiterer 48-stündiger Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen fixiert und gewaschen und mit dem Farbstoff Sulforhodamin B behandelt. Sulforhodamin B bindet an basische Aminosäurereste in Proteinen und dient der spektralphotometrischen Bestimmung der Zellmasse. Die fixierten Zellen wurden angefärbt und konnten so quantifiziert werden. Aus der Zellmasse wurde das prozentuale Zellwachstum ermittelt.¹⁷⁴

Zunächst wurden die Verbindungen **31j**, **67g** und **67l** in einem *one dose 60 cell line assay* bei einer Konzentration von 10 µM (*single dose*) getestet. Das Testergebnis wird in einem *one dose mean graph* dargestellt. In dem *one dose mean graph* wird das Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Wachstum 100%) in Prozent ausgedrückt. Eine Wachstumsinduktion liegt vor, wenn das Zellwachstum der behandelten Zellen oberhalb von 100% liegt. Wurde das Wachstum gehemmt, liegt das Zellwachstum zwischen 0% und 100%. Ein Wachstum unterhalb von 0% bedeutet, dass die Zellen abgetötet wurden. Die zentrale senkrechte Achse im Balkendiagramm beschreibt das durchschnittliche Wachstum aller Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Bei **31j** wurde eine signifikante Inhibition des Zellwachstum im *one dose 60 cell line assay* ermittelt, so dass eine weitere Untersuchung der Verbindung bei fünf

verschiedenen Testkonzentrationen (100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM) an den 60 Zelllinien durchgeführt wurde. Die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven aus dem *5-dose screening* ermöglichen die Bestimmung von GI_{50} -Werten (*growth inhibition 50%*), TGI-Werten (*total growth inhibition*) und LC_{50} -Werten (*lethal concentration 50%*) als molare Substanzkonzentration. Für jede dieser Kennzahlen wurde ein Mittelwert (*mean graph midpoint*, MG-MID) berechnet, der die antiproliferative Aktivität einer Testverbindung für alle untersuchten Zelllinien angibt. Die graphische Darstellung der einzelnen Werte erfolgte in Form eines Balkendiagramms, dem sog. *mean graph*. Dabei bildet die senkrechte Achse den *mean graph midpoint*.¹⁴⁶

Tabelle 7-10: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **31j**, **67g** und **67l**
(Zellwachstum in [%] bei 10 μ M); $\log_{10}GI_{50}$ [M] für **31j**^{a,b}



Zelllinie	31j	67g	67l	$\log_{10}GI_{50}$ [M] 31j
Leukämie				
CCRF-CEM	n.b.	142.42	94.78	-5.25/-5.52
HL-60(TB)	5.65	92.64	78.72	n.b./-6.03
K-562	15.57	101.39	101.50	n.b./-6.30
MOLT-4	24.42	99.09	89.33	n.b./-5.58
RPMI-8226	n.b.	126.42	107.38	-5.19/-5.57
SR	4.74	n.b.	n.b.	n.b./n.b.
NSCLC				
A549/ATCC	19.78	99.74	101.21	-5.57/-5.63
EKVX	28.04	101.67	102.21	-5.37/-4.53
HOP-62	18.70	105.70	116.50	-5.61/-5.58
HOP-92	n.b.	n.b.	119.92	-4.52/-5.89
NCI-H226	69.38	99.36	103.24	-5.06/-4.92
NCI-H23	25.55	103.41	94.89	-5.46/-5.37
NCI-H322M	38.20	110.58	107.48	-5.47/-5.73
NCI-H460	3.70	112.57	108.59	-5.98/-5.60
NCI-H522	3.00	113.64	118.04	-6.15/-5.17
Darmkrebs				
COLO 205	73.82	118.75	122.23	-4.85/-4.80
HCC-2998	40.07	101.75	107.08	-5.53/-5.72
HCT-116	4.42	118.26	103.39	-5.99/-5.95
HCT-15	8.75	100.89	90.68	-6.22/-6.16
HT29	52.48	125.78	113.91	-5.48/-4.30
KM12	15.86	111.85	107.72	-6.16/-6.08
SW-620	11.01	111.27	108.60	-6.22/-6.20
ZNS-Krebs				
SF-268	36.05	109.31	112.28	-5.39/-5.47
SF-295	-45.93	110.05	104.14	-5.54/-5.56
SF-539	6.99	96.60	103.76	-5.83/-5.61
SNB-19	51.57	104.12	110.23	-5.36/-4.80
SNB-75	-6.22	85.32	102.41	-6.02/n.b.
U251	19.08	92.35	104.47	-5.74/-5.61

^a n.b.: nicht bestimmt

^b Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

Tabelle 7-10: Ergebnisse des *one dose mean graph* von **31j**, **67g** und **67l**
(Zellwachstum in [%] bei 10 µM); log₁₀GI₅₀ [M] für **31j**^{a,b} (Fortsetzung)

Zelllinie	31j	67g	67l	log ₁₀ GI ₅₀ [M] 31j
Melanom				
LOX IMVI	23.47	99.51	93.50	-5.75/-5.69
M14	-25.44	114.23	101.59	-6.03/-6.16
MALME-3M	n.b.	98.68	110.61	-5.36/-6.00
MDA-MB-435	-39.24	107.16	99.32	-6.71/-6.73
SK-MEL-2	24.58	144.05	128.19	-5.99/-5.02
SK-MEL-28	47.74	98.16	117.61	-5.04/-6.01
SK-MEL-5	-48.40	112.55	n.b.	-5.81/-5.77
UACC-257	54.67	108.67	105.67	-5.10/-5.53
UACC-62	40.86	98.75	109.21	-5.49/-5.00
Ovarial-Krebs				
IGROV1	6.52	113.31	116.62	-5.63/n.b.
NCI/ADR-RES	0.62	101.49	107.61	-5.54/-5.62
OVCAR-3	-19.71	124.38	113.34	-6.24/-5.89
OVCAR-4	27.34	100.68	103.91	-5.07/-5.54
OVCAR-5	74.54	99.64	102.30	-5.12/-5.16
OVCAR-8	28.65	101.49	96.95	-5.38/-5.55
SK-OV-3	18.80	122.70	111.90	-6.39/-6.36
Nierenkrebs				
786-0	15.11	100.11	97.86	-5.64/-5.48
A498	48.67	113.87	95.81	-5.42/5.58
ACHN	22.95	106.92	96.15	-5.66/-5.49
CAKI-1	-59.93	105.59	102.96	-5.79/-6.99
RXF 393	13.06	119.51	107.52	-5.46/-5.89
SN12C	37.34	100.98	100.89	-5.54/-5.39
TK-10	19.38	118.41	107.21	-5.47/-4.31
UO-31	20.61	97.61	104.60	-5.81/-5.87
Prostatakrebs				
DU-145	24.20	116.10	114.39	-5.62/-5.60
PC-3	n.b.	105.69	106.51	-5.18/-5.44
Brustkrebs				
BT-549	25.87	125.18	107.80	-5.87/-5.74
HS 578T	-1.56	120.30	107.79	-5.84/-5.77
MCF7	18.36	n.b.	n.b.	-6.12/-6.75
MDA-MB-231/ATCC	62.34	88.76	114.15	-5.30/-5.23
MDA-MB-468	11.91	99.37	92.18	-5.58/-5.65
T-47D	39.02	102.19	107.39	-5.41/-5.27
Mittleres Zellwachstum	18.85	108.18	105.55	-5.61/-5.63

^a n.b.: nicht bestimmt

^b Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

7.3.5 Durchführung der molekularen Docking-Studien

Das Docking zur Untersuchung des potentiellen Bindemodus von **31j** wurde von Jan Dreher, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, durchgeführt. Die Dockingstudien erfolgten mit FRED¹⁷⁵ mit den voreingestellten Parametern.

Als Vorbereitung für das Docking wurde das Kristallwasser entfernt. Mit Hilfe von MOE's Protonate 3D¹⁷⁶ wurden für die Proteinvorbereitung formale Ladungen gesetzt und fehlende Wasserstoffatome zu den Aminosäuren hinzugefügt.

Die Bewertung der ermittelten Docking-Posen erfolgte mit OMEGA¹⁷⁷ mit "high-quality settings (HQS)", wie von Kirchmair et al. vorgeschlagen¹⁷⁸ (HQS steht für maxconfs 500, rms 0.4 und bmmff94s_trunc).

Für das molekulare Docking wurde die PLK1-Röntgenkristallstruktur 2OWB aus der Proteindatenbank (PDB) gewählt.¹⁴⁸

Die Visualisierung der Dockingresultate erfolgte mit PyMOL viewer.¹⁷⁹

7.3.6 Berechnung der Elektronendichteverteilung

Die Berechnungen wurden von Dr. Lutz Preu, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, durchgeführt. Die Elektronendichteverteilung wurde mit dem Programm HyperChem 8.0.4 berechnet.¹⁸⁰ Die Geometrieoptimierung erfolgte mit dem semiempirischen Modul PM3, Abbruchkriterium war ein RMS-gradient von 0.1 kcal/Å·mol. Die Partialladungen wurden mit einer Mulliken Populationsanalyse bestimmt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Cohen, P.: Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 309-315.
- [2] Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- [3] Blume-Jensen, P., Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, 411, 355-365.
- [4] Pawson, T., Scott, J. D.: Protein phosphorylation in signaling - 50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 286-290.
- [5] Cowan-Jacob, S. W.: Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 2608-2625.
- [6] Ventura, J.-J., Nebreda, A. R.: Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2006**, 8, 153-160.
- [7] Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T., Ashford, V. A., Xuong, N.-H., Taylor, S. S., Sowadski, J. M.: Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate - dependent protein kinase. *Science* **1991**, 253, 407-414.
- [8] Schwartz, P. A., Murray, B. W.: Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 192-210.
- [9] Sarno, S., Papimutto, E., Franchin, C., Bain, J., Elliot, M., Meggio, F., Kazimierczuk, Z., Orzesko, A., Zanotti, G., Battistutta, R., Pinna, L. A.: ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 1340-1351.
- [10] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
- [11] Ghose, A. K., Herbertz, T., Pippin, D. A., Salvino, J. M., Mallamo, J. P.: Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.

-
- [12] Liao, J. J.-L.: Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 409-424.
- [13] Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *IL Farmaco* **2004**, 59, 759-765.
- [14] Hanks, S. K.: Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **2003**, 4, 111-118.
- [15] Ellis, L. M., Hicklin, D. J.: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumor activity. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 579-591.
- [16] Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., Claesson-Welsh, L.: Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol. Aspects Med.* **2011**, 32, 88-111.
- [17] Roskoski, R.: VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2008**, 375, 287-291.
- [18] Roodink, I., Leenders, W. P. J.: Targeted therapies of cancer: Angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett.* **2010**, 299, 1-10.
- [19] Bahassi, E. M.: Polo-like kinases and DNA damage checkpoint: beyond the traditional mitotic functions. *Exp. Biol. Med.* **2011**, 236, 648-657.
- [20] Strebhardt, K.: Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 643-660.
- [21] Strebhardt, K., Ullrich, A.: Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 321-330.
- [22] Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M., Nakagawara, A.: Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 25549-25561.
- [23] Degenhardt, Y., Lampkin, T.: Targeting polo-like kinase in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 384-389.
- [24] Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J., Miyakawa, I.: Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* **2005**, 24, 287-291.

- [25] Beria, I., Bossi, R. T., Brasca, M. G., Caruso, M., Ceccarelli, W., Fachin, G., Fasolini, M., Forte, B., Fiorentini, F., Pesenti, E., Pezzetta, D., Posterì, H., Scolaro, A., Depaolini, S. R., Valsasina, B.: NMS-P937, a 4,5-dihydro-1*H*-pyrazolo[4,3-*h*]quinazoline derivative as potent and selective polo-like kinase 1 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2969-2974.
- [26] McInnes, C., Wyatt, M. D.: PLK1 as an oncology target: current status and future potential. *Drug Discov. Today* **2011**, 16, 619-625.
- [27] Murugen, R. N., Park, J.-E., Kim, E.-H., Shin, S. Y., Cheong, C., Lee, K. S., Bang, J. K.: Plk1-targeted small molecule inhibitors: molecular basis for their potency and specificity. *Mol. Cells* **2011**, 32, 209-220.
- [28] Gianoncelli, A., Cozza, G., Orzesko, A., Meggio, F., Kazimierczuk, Z., Pinna, L. A.: Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7281-7289.
- [29] Hanif, I. M., Hanif, I. M., Shazib, M. A., Ahmad, K. A., Pervaiz, S.: Casein Kinase II: An attractive target for anti-cancer drug design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, 42, 1602-1605.
- [30] Sarno, S., Pinna, L. A.: Protein kinase CK2 as a druggable target. *Mol. Bio. Syst.* **2008**, 4, 889-894.
- [31] Prudent, R., Sautel, C. F., Cochet, C.: Structure-based discovery of small molecules targeting different surfaces of protein-kinase CK2. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1804, 493-498.
- [32] Pagano, M. A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzesko, A., Meggio, F., Pinna, L. A.: The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem. J.* **2008**, 415, 353-365.
- [33] Malumbres, M., Barbacid, M.: Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2007**, 17, 60-65.
- [34] Choi, S.-J., Lee, J.-E., Jeong, S.-Y., Im, I., Lee, S.-D., Lee, E.-J., Lee, S. K., Kwon, S.-M., Ahn, S.-G., Yoon, J.-H., Han, S.-Y., Kim, J.-I., Kim, Y.-C.: 5,5'-substituted Indirubin-3'-oxime derivatives as potent cyclin-dependent kinase inhibitors with anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3696-3706.
- [35] Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., Bischoff, J. R.: CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, 29, 16-21.

- [36] Hu, X., Moscinski, L. C.: Cdc2: a monopotent or pluripotent CDK? *Cell Prolif.* **2011**, 44, 205-211.
- [37] Dickson, M. A., Shah, M. A., Rathkopf, D., Tse, A., Carvajal, R. D., Wu, N., Lefkowitz, R. A., Gonen, M., Cane, L. M., Dials, H. J., Schwartz, G. K.: A phase I clinical trial of FOLFIRI in combination with the pan-cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 66, 1113-1121.
- [38] Cicenas, J., Valius, M.: The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2011**, 137, 1409-1418.
- [39] Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.
- [40] Kannan, N., Neuwald, A. F.: Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2. *Protein Sci.* **2004**, 13, 2059-2077.
- [41] Meijer, L., Flajolet, M., Greengard, P.: Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 471-480.
- [42] Buescher, J. L., Phiel, C. J.: A noncatalytic domain of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is essential for activity. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 7957-7963.
- [43] Doble, B. W., Woodgett, J. R.: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 1175-1186.
- [44] Ali, A., Hoeflich, K. P., Woodgett, J. R.: Glycogen Synthase Kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2527-2540.
- [45] Huang, H.-C., O'Brien, W. T., Klein, P. S.: Targeting glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease. *Drug Discov. Today* **2006**, 3, 613-619.
- [46] Mishra, R.: Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol. Cancer* **2010**, 9, 144-158.

- [47] Luo, J.: Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett.* **2009**, 273, 194-200.
- [48] Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J., Reith, A. D., Holder, J. C.: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 793-803.
- [49] Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y., Biernat, J., Mandelkow, E., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. W., Sausville, E. A., Kunick, C., Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5983-5994.
- [50] Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y. Z., Mandelkow, E. M., Eisenbrand, G., Meijer, L.: Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 251-260.
- [51] Morphy, R.: Selectively nonselective kinase inhibition: Striking the right balance. *J. Med. Chem.* **2009**, 53, 1413-1437.
- [52] Knight, Z. A., Lin, H., Shokat, K. M.: Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 130-137.
- [53] Espinoza-Fonesca, L. M.: The benefits of the multi-target approach in drug design and discovery. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 896-897.
- [54] Klebl, B., Müller, G., Hamacher, M.: Protein kinases as drug targets. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **2011**, 49, 147-154.
- [55] Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., Angiolini, M.: Through the "gatekeeper door": Exploiting the active kinase conformation. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2681-2694.
- [56] Gray, N. S., Liu, Y.: Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 358-364.

-
- [57] Zhang, J., Yang, P. L., Gray, N. S.: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 28-39.
- [58] Deininger, M. W., Druker, B. J.: Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55, 401-423.
- [59] Madhusudan, T., Ganesan, T. S.: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clin. Biochem.* **2004**, 37, 618-635.
- [60] McArthur, G. A., Demetri, G. D., van Oosterom, A., Heinrich, M. C., Debiec-Rychter, M., Corless, C. L., Nikolova, Z., Dimitrijevic, S., Fletcher, J. A.: Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 866-873.
- [61] Vaidya, S., Gosh, K., Vundinti, B. R.: Recent development in drug resistance in chronic myeloid leukemia: a review. *Eur. J. Haematol.* **2011**, 87.
- [62] Olivieri, A., Manzione, L.: Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Ann. Oncol.* **2007**, 18 Suppl 6, vi42-vi46.
- [63] Breccia, M., Alimena, G.: Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. *Leuk. Res.* **2010**, 34, 129-134.
- [64] Manley, P. W., Stiefl, N., Cowan-Jacob, S. W., Kaufman, S., Mestan, J., Wartmann, M., Wiesmann, M., Woodmanb, R., Gallagher, N.: Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6977-6986.
- [65] Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., Fujita, Y., Okinaga, S., Hirano, H., Yoshimori, K., Harada, T., Ogura, T., Ando, M., Miyazawa, H., Tanaka, T., Saijo, Y., Hagiwara, Y., Morita, S., Nukiwa, T.: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 362, 2380-2388.
- [66] Muir, V. J., Dhillon, S.: Erlotinib: as maintenance monotherapy in non-small-cell lung cancer. *BioDrugs* **2011**, 25, 139-146.
- [67] Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., Oliva, C., Rubin, S. D., Stein, S.,

- Cameron, D.: Lapatinib plus Capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 355, 2733-2743.
- [68] FDA: Center for drug evaluation and research, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/022059s011s012l.bl.pdf, abgerufen am 10.12.2011.
- [69] Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R. A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S.: Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 835-844.
- [70] Dalglish, A., Copier, J.: New multitargeted treatments with antiangiogenic and antitumor activity: focus on sunitinib. *Targ. Oncol.* **2007**, 2, 17-29.
- [71] Gotink, K. J., Verheul, H. M. W.: Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* **2010**, 13, 1-14.
- [72] Commander, H., Whiteside, G., Perry, C.: Vandetanib first global approval. *Drugs* **2011**, 71, 1355-1365.
- [73] Schöffski, P., Dumez, H., Clement, P., Hoeben, A., Prenen, H., Wolter, P., Joniau, S., Roskams, T., Van Poppel, H.: Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. *Ann. Oncol.* **2006**, 17, 1185-1196.
- [74] Neye, H.: Monoklonale Antikörper: Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel. *Pharm. Ztg.* **2006**, 151, 3960-3970.
- [75] Li, J., Zhu, Z.: Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, 31, 1198-1207.
- [76] Pearson, M. A., Fabbro, D.: Targeting protein kinases in cancer therapy: a success? *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, 4, 1113-1124.
- [77] Dean, N. M., Bennett, F.: Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* **2003**, 22, 9087-9096.
- [78] Rayburn, E. R., Zhang, R.: Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible? *Drug Discov. Today* **2008**, 13, 513-521.

- [79] Meijer, L., Shearer, J., Bettayeb, K., Ferandin, Y.: Diversity of the intracellular mechanisms underlying the anti-tumor properties of indirubins. In: *Indirubin, the red shade of indigo*. Meijer, L., Guyard, N., Skaltsounis, L. A., Eisenbrand, G. (Editors), **2007**, chapter 24, 234-246, Life in Progress, Station Biologique de Roscoff.
- [80] Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G., Meijer, L.: Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* **2001**, 20, 3786-3797.
- [81] Lin, C., Huang, H., Chien, C., Tzeng, D., Lung, F.: Purple urine bag syndrome in nursing homes: Ten elderly case reports and a literature review. *Clin. Interv. Aging* **2008**, 3, 729-734.
- [82] Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S., Muehlbeyer, S.: Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2004**, 130, 627-635.
- [83] Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E. M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L.: Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 60-67.
- [84] Beauchard, A., Ferandin, Y., Frère, S., Lozach, O., Blairvacq, M., Meijer, L., Thiéry, V., Besson, T.: Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 6434-6443.
- [85] Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C. A. 3rd, Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T.: Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 31475-31478.
- [86] Tseng, A. S., Engel, F. B., Keating, M. T.: The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem. Biol.* **2006**, 13, 957-963.
- [87] Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Greengard, P.: GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1255-1266.

- [88] Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Leost, M., Greengard, P., Meijer, L.: Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 935-946.
- [89] Ribas, J., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Knockaert, M., Garrofé-Ochoa, X., Totzke, F., Schächtele, C., Mester, J., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Boix, J., Meijer, L.: 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death. *Oncogene* **2006**, 25, 6304-6318.
- [90] Ribas, J., Yuste, V.J., Garrofé-Ochoa, X., Meijer, L., Esquerda, J. E., Boix, J.: 7-Bromoindirubin-3'-oxime uncovers a serine protease-mediated paradigm of necrotic cell death. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 76, 39-52.
- [91] Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K. M., Meijer, L., Mikros, E., Skaltsounis, A.-L., Soteriadou, K.: 6-Br-5-methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* **2009**, 39, 1289-1303.
- [92] Kohfeld, S.: Untersuchungen zur Synthese, biologischen Aktivität und Stabilität von Paullonen und verwandten *d*-anellierten [1]Benzazepinonen. Dissertation Universität Braunschweig, **2006**.
- [93] Egert-Schmidt, A.-M., Dreher, J., Dunkel, U., Kohfeld, S., Preu, L., Weber, H., Ehler, J. E., Mutschler, B., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Baumann, K., Kunick, C.: Identification of 2-anilino-9-methoxy-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-ones as dual PLK1/VEG-R2 kinase inhibitor chemotypes by structur-based lead generation. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2433-2442.
- [94] Rudolph, D., Steegmaier, M., Hoffmann, M., Grauert, M., Baum, A., Quant, J., Haslinger, C., Garin-Chesa, P., Adolf, G. R.: BI 6727, a polo-like kinase inhibitor with improved pharmacokinetic profile and broad antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 3094-3102.
- [95] Caruso, M., Valsasina, B., Ballinari, D., Bertrand, J., Brasca, M. G., Caldarelli, M., Cappella, P., Fiorentini, F., Gianellini, L. M., Scolaro, A., Beria, I.: 5-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrrole and 2-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-1,5,6,7-tetrahydro-pyrrolo[3,2-*c*]pyridin-4-one derivatives as new classes of selective and orally available polo-like kinase 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 96-101.

- [96] Golub, A. G., Yakovenko, O. Y., Prykhodko, A. O., Lukashov, S. S., Bdzhola, V. G., Yarmoluk, S. M.: Evaluation of 4,5,6,7-tetrahalogeno-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones as inhibitors of human protein kinase CK2. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1784, 143-149.
- [97] Vougiotiannopoulou, K., Ferandin, Y., Bettayeb, K., Myrianthopoulos, V., Lozach, O., Fan, Y., Johnson, C. H., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Mikros, E., Meijer, L.: Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase-3 alter circadian period. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6421-6431.
- [98] Shaaban, M. R., Saleh, T. S., Osman, F. H., Farag, A. M.: Regioselective synthesis of some novel pyrazoles, isoxazoles, pyrazolo[3,4-*d*]pyridazines and isoxazolo[3,4-*d*]pyridazines pendant to benzimidazole. *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, 44, 177-185.
- [99] Chen, W.-Y., Gilman, N. W.: Synthesis of 7-phenylpyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-2-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 663-666.
- [100] Berger, B. M.: Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen auf der Basis von 7-Acetyl-1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-1-benzazepin-2-on: Synthese und biologische Aktivität. Dissertation Universität Braunschweig, **2007**.
- [101] Tavares, F. X., Boucheron, J. A., Dickerson, S. H., Griffin, R. J., Preugschat, F., Thomson, S. A., Wang, T. Y., Zhou, H.-Q.: *N*-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-*b*]pyridazin-3-yl-pyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4716-4730.
- [102] Moffat, D. F. C., Allen, R. A., Rapecki, S. E., Davis, P. D., O'Connell, J., Hutchings, M. C., King, M. A., Boyce, B. A., Perry, M. J.: 4-Thiophenoxy-*N*-(3,4,5-trialkoxypheyl)-pyrimidine-2-amines as potent and selective inhibitors of the T-cell tyrosine kinase p56lck. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 747-753.
- [103] Hamama, W. S., Ismail, M. A., Al-Saman, H. A., Zoorob, H. H.: Convenient selective synthesis of substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidones and annulated derivatives. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2007**, 62b, 104-110.
- [104] Maeba, I., Nishiyama, Y., Wakimura, M., Tabata, T.: Synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (5-deazapteridine) C-nucleosides from a glycosyl enaminone. *Carbohydr. Res.* **1996**, 290, 71-77.

- [105] Robins, R. K., Hitchings, G. H.: Studies on condensed pyrimidine systems. XIX. A new synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. The condensation of 1,3-diketones and 3-ketoaldehydes with 4-aminopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3449-3457.
- [106] Sako, M.: Product Class 19: Pyridopyrimidines. In: *Science of synthesis*, category 2, volume 16: Six-membered hetarenes with two identical heteroatoms (Hrsg.: Y. Yamamoto), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2004**, 1155-1267.
- [107] Wood, H. C. S., Wrigglesworth, R., Yeowell, D. A., Gurney, F. W., Hurlbert, B. S.: Specific enzyme inhibitors in vitamin biosynthesis. Part II. Revised structures for some 8-substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 1225-1230.
- [108] Yamamoto, H., Takeda, H., Nitta, M.: Studies on pyrimidine-annulated heterocycles: Synthesis and dynamic properties of [n](2,4)-pyridinophanes (n = 11,9,8,6). *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, 53, 1891-1903.
- [109] Bagley, M. C., Hughes, D. D., Lloyd, R., Powers, V. E. C.: A new and highly expedient synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6585-6588.
- [110] Troschütz, R., Anders, E.: Michael-Addition von 6-Aminopyrimidin-4-onen an Enone: Semi-empirische MO-Rechnungen sowie experimentelle Untersuchungen. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 341-348.
- [111] Vasudevan, A., Mavandadi, F., Chen, L., Gangjee, A. : Reactions of 6-aminopyrimidines with biselectrophiles: Manipulation of product composition with solvent and pyrimidine substitution variation. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 634-638.
- [112] Shaaban, M. R., Saleh, T. S., Farag, A. M.: Synthesis and antimicrobial evaluation of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine and pyrimimido[1,2-*a*]benzimidazole derivatives. *Heterocycles* **2007**, 71, 1765-1777.
- [113] Egert-Schmidt, A.-M. L.: Neue *d*-anellierte 1-Benzazepinone und deren azaanaloge Verbindungen als Multikinase-Inhibitoren: Synthese und biologische Aktivität. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2009**.
- [114] Breitmaier, E.: Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen. Teubner-Verlag Stuttgart, **1992**.

- [115] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [116] Pratt, D. S., Young, C. O.: Phthalic acid derivatives: Constitution and color, XIV. Some derivatives of tetrabromophthalimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, 40, 1415-1425.
- [117] Aguilar-Parrilla, F., Cativiela, C., Diaz de Villegas, M. D., Elguero, J., Foces-Foces, C., Laureiro, J. I. G., Cano, F. H., Limbach, H.-H., Simth, J. A. S., Toiron, C.: The tautomerism of 3(5)-phenylpyrazoles: an experimental (^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR and X-ray crystallography) study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1737-1742.
- [118] Weinmann, H., Harre, M., Koenig, K., Merten, E., Tilstam, U.: Efficient and environmentally friendly synthesis of 2-aminoimidazole. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 593-595.
- [119] Storey, B. T., Sullivan, W. W., Moyer, C. L.: The pK_a -values of some 2-aminoimidazolium ions. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3118-3120.
- [120] Alder, R. W., Allen, P. R., Williams, St. J.: Stable carbenes as strong bases. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1267-1268.
- [121] Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W.: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, 4. Aufl. Springer-Verlag, Heidelberg, **2001**, 186.
- [122] Staab, H. A., Irgartinger, H., Mannschreck, A., Wu, M.-Th.: Untersuchungen zum H/D-Austausch bei Azolen und Azolium-Salzen. *Liebigs Ann. Chem.* **1966**, 695, 55-64.
- [123] Drew, H. D. K., Pearman, F. H.: Chemiluminescent organic compounds. Part IV. Amino- and hydrazinocyclophthalhydrazides and their relative luminescent power. *J. Chem. Soc.* **1938**, 132, 586-592.
- [124] Cross, B. E., Drew, H. D. K.: Chemiluminescent organic compounds. Part VIII. Substitution in the aminogroup of "luminol" and its effect on the luminescence. *J. Chem. Soc.* **1949**, 137, 638-641.
- [125] Pies, T.: 9-Substituted paullones: Synthesis and analysis of structure-activity relationships. Dissertation Universität Hamburg, **2003**.

- [126] Soliman, R.: Preparation and antidiabetic activity of some sulfonylurea derivatives of 3,5-disubstituted pyrazoles. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 321-325.
- [127] Enders, E.: Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Arylhydrazinen und Arylhydrazonen. In: Stroh, R. (Hrsg.). *Stickstoffverbindungen* 1. Band 10/2., In: Müller, E. (Hrsg.) *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1967**, 201-217.
- [128] Robinson, B.: The Fischer indole synthesis. *Chem. Rev.* **1963**, 63, 373-401.
- [129] Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 297-299.
- [130] Fritzpatrick, J. T., Hiser, R. D.: Noncatalytic Fischer indole synthesis. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1703-1704.
- [131] Stukenbrock, H.: Design und Synthese neuartiger GSK-3-Inhibitoren: Wirkstoffe zur Protektion und Proliferationsstimulation pankreatischer β -Zellen. Dissertation Universität Braunschweig, **2008**.
- [132] Slätt, J., Bergmann, J.: Oxygenation of 2,3-dihydroindole. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9187-9191.
- [133] Kelly, A. H., McLeod, D. H., Parrock, J.: Thermal indolization of arylhydrazones. *Can. J. Chem.* **1964**, 43, 296-301.
- [134] Nakazaki, M., Yamamoto, K.: Direct synthesis of indole by the Fischer indole synthesis. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 1877.
- [135] Robinson, B.: Recent studies on the Fischer indole synthesis. *Chem. Rev.* **1969**, 69, 227-250.
- [136] Eaton, P. E., Carlson, G. R., Lee, J. T.: Phosphorus pentoxide-methanesulfonic acid. Convenient alternative to polyphosphoric acid. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 4071-4073.
- [137] Goudarshivannanavar, B. C., Jayadevappa, H., Mahadevan, K. M.: A convenient synthesis of 2(2-benzo[*b*]furo)indoles and benzofuopyrazoles. *Indian J. Chem.* **2009**, 48B, 1419-1423.

- [138] Kitzen, J. J. E. M., de Jonge, M. J. A., Verweij, J.: Aurora kinase inhibitors. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2010**, 73, 99-110.
- [139] Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., Zhang, C.: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **2007**, 5, 1-10.
- [140] Vader, G., Lens, S. M. A.: The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1786, 60-72.
- [141] Zamir, E., Geiger, B.: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 3583-3590.
- [142] Golubovskaya, V. M., Conway-Dorsey, K., Edmiston, S. N., Tse, C., Lark, A. A., Livasy, C. A., Moore, D., Millikan, R. C., Cance, W. G.: FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. *Int. J. Cancer* **2009**, 125, 1735-1738.
- [143] Luo, M., Guan, J.-L.: Focal adhesion kinase: A prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* **2010**, 289, 127-139.
- [144] van Nimwegen, M. J., van de Water, B.: Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73, 597-609.
- [145] Shoemaker, R. H.: The NCI 60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 813-823.
- [146] Boyd, R. B., Paull, K. D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91-109.
- [147] Kunick, C., Bleeker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Link, A.: Matrix compare analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[b]cyclopenta[e]azepine-4,10(1*H*,5*H*)-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2148-2153.
- [148] Kothe, M., Kohls, D., Low, S., Coti, R., Cheng, A. C., Jacques, S. L., Johnson, T. L., Lewis, C., Loh, C., Nonomiya, J., Sheils, A. L., Verdries, K. A., Wynn, T. A., Kuhn, C., Ding, Y. H.: Structure of the catalytic domain of human polo-like kinase 1. *Biochem.* **2007**, 46, 5960-5971.

- [149] Andrzejewska, M., Pagano, M. A., Meggio, F., Brunati, A. M., Kazimierczuk, Z.: Polyhalogenobenzimidazoles: Synthesis and their inhibitory activity against casein kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3997-4002.
- [150] Meggio, F., Shugar, D., Pinna, L. A.: Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* **1990**, 187, 89-94.
- [151] Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S. P., Donella-Deana, A., Shugar, D., Pinna, L. A.: Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2. *FEBS Lett.* **2001**, 496, 44-48.
- [152] Pagano, M. A., Meggio, F., Ruzzene, M., Andrzejewska, M., Kazimierczuk, Z., Pinna, L. A.: 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazole: A novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 321, 1040-1044.
- [153] Prasad, J., Manley, J. L.: Regulation and substrat specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 4139-4149.
- [154] Fedorov, O., Huber, K., Eisenreich, A., Fillippakopoulos, P., King, O., Bullock, A. N., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., Fabbro, D., Trappe, J., Rauch, U., Bracher, F., Knapp, S.: Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing. *Chem. Biol.* **2011**, 18, 67-76.
- [155] Hagiwara, M.: Alternative splicing: A new drug target of the post-genome era. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1754, 324-331.
- [156] Rosenthal, S. R., Tanega, C., Shen, M., Mott, B. T., Bougie, J. M., Nguyen, D.-T., Misteli, T., Auld, D. S., Maloney, D. J., Thomas, C. J.: Potent and selective small molecule inhibitors of specific isoforms of Cdc2-like kinases (Clk) and dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases (Dyrk). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3152-3158.
- [157] Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M. V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A. R., Suzuki, M., Hagiwara, M.: Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of CLKs. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 24246-24254.
- [158] Aranda, S., Laguna, A., de la Luna, S.: DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, und functional roles. *FASEB J.* **2011**, 25, 449-462.

- [159] Yoshida, K.: Role for DYRK family kinases on regulation of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 76, 1389-1394.
- [160] Becker, W., Sippl, W.: Action, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, 278, 246-256.
- [161] Becker, W.: Recent insight into the function of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, 278, 222.
- [162] Friedman, E.: The Kinase Mirk/DYRK1B: A possible therapeutic target in pancreatic cancer. *Cancers* **2010**, 2, 1492-1512.
- [163] Mercer, S. E., Friedman, E.: Mirk/Dyrk1B. *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, 45, 303-315.
- [164] Miller C. T., A. S., Lin T. K., Dagenais S. L., Contreras J. I., Orringer M. B., Glover T. W., Beer D. G., Lin L.: Amplification and overexpression of the dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2) gene in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **2003**, 63, 4136-4143.
- [165] Amarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: Purification of laboratory chemicals. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, USA.
- [166] Rice, L. M., Scott, K. R.: Imidothiazoles. *J. Med. Chem.* **1968**, 11, 183-185.
- [167] Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.
- [168] Beauchard, A., Laborie, H., Rouillard, H., Lozach, O., Ferandin, Y., Guével, R., Guguen-Guillouzo, C., Meijer, L., Besson, T., Thiéry, V.: Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6257-6263.
- [169] Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D., Galons, H., Dierick, J.-F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schächtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N., Meijer, L.: Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 31208-31219.

- [170] Debdab, M., Carreaux, F., Renault, S., Soundararajan, M., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Lozach, O., Babault, L., Tahtouh, T., Baratte, B., Ogawa, Y., Hagiwara, M., Eisenreich, A., Rauch, U., Knapp, S., Meijer, L., Bazureau, J.-P.: Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge Leucettamine B: Modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4172-4186.
- [171] Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.-G., Moulinoux, J.-P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 527-536.
- [172] Reinhardt, J., Ferandin, Y., Meijer, L.: Purification of CK1 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 54, 101-109.
- [173] Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J.-L., Jho, E., Constantini, F., Meijer, L.: Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expr. Purif.* **2000**, 20, 394-404.
- [174] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
- [175] FRED, 2.2.5, 2011, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA.
- [176] MOE, 2010.10, 2010, ChemComp, Montreal, Canada.
- [177] OMEGA, 2.3.2, 2011, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA.
- [178] Kirchmair, J., Wolber, G., Laggner, C., Langer, T.: Comparative performance assessment of the conformational model generators Omega and catalyst: A large-scale survey on the retrieval of protein-bound ligand conformations. *J. Chem. Inf. Model* **2006**, 46, 1848-1861.
- [179] PyMOL Molecular Graphics System, 1.2r1, Schrödinger, LLC, New York, USA.
- [180] HyperChem 8.0.4, Hypercube, Inc., Gainesville, Florida.

Danksagung

Für die Durchführung von Assays an Proteinkinasen bedanke ich mich bei Herrn Y. Ferandin und Herrn Prof. Dr. L. Meijer der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Frankreich), Herrn Dr. M. Kubbutat, Herrn Dr. C. Schächtele, Herrn Dr. F. Totzke, und der Firma ProQinase/KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg, sowie Herrn Dr. G. Cozza, Frau Dr. M. Ruzzene und Herrn Prof. Dr. L. A. Pinna der Universität Padua, Italien.

Den Mitarbeitern des National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA, möchte ich für die Durchführung der biologischen Testungen an humanen Tumorzelllinien danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Dreher, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die Durchführung der Docking-Studien.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. L. Preu, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die fachliche Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen aussprechen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom sowie Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken. Herrn Dr. U. Papke, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig, danke ich für die Erstellung der Massenspektren. Bei Herrn Prof. Dr. P. G. Jones, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig, bedanke ich mich für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analysen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich gilt mein Dank für die Probenvorbereitung der NMR-Experimente, die Durchführung der Elementaranalysen sowie für die Aufnahme der FT-IR-Spektren. Bei den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig möchte ich mich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten sowie deren technische Unterstützung bedanken.

Meiner wissenschaftlichen Hilfskraft Herrn A. Masch sei für seine unterstützende Tätigkeit in meinem Labor gedankt.

Den ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern meines Arbeitskreises Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. W. Fugel, Frau Dr. S. Schmidt, Frau Dr. N. Tolle, Frau J. Ryczak, Herrn H. Falke, Frau A. Lader, Frau R. Korn, Frau F. Maiwald, Herrn S. Wölfel und Frau A. Walter danke ich ganz herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die schöne Zeit am Institut.

Frau Dr. S. Schmid, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. W. Fugel, Herrn S. Kühne, Herrn A. Meyer, Frau A. Lader, Frau R. Korn und Herrn S. Wölfel danke ich besonders für die schöne Zusammenarbeit im Praktikum „Chemie einschließlich der Analytik der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ des 3. Semesters.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. L. Preu für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Schwester Silvia und meinem Lebensgefährten Frank für die stetige Unterstützung und Motivation.